

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité : Neurosciences

présentée par

Pierre-Gilles HENRY

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris 6

**Spectroscopie RMN *in vivo* du cerveau à 3 Tesla :
développements méthodologiques pour l'étude
de modèles animaux de la maladie de Huntington**

Soutenue le 7 décembre 2000 devant le jury composé de :

MM.	M. DECORPS	Rapporteur
	J.M. FRANCONI	Rapporteur
	G. BLOCH	Responsable du travail de thèse
	Y. SAMSON	Directeur de thèse
	A. VOLK	
	D. WECKER	

Laboratoire d'accueil : CEA, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) dans le département de Recherche Médicale du CEA. Je remercie le M. le Professeur André Syrota de m'avoir accueilli dans son service et de m'avoir ainsi fait bénéficier de moyens techniques et humains exceptionnels.

Ce travail a été cofinancé par la société Bruker S.A., le laboratoire Novo Nordisk S.A. et le CEA. Je remercie MM. Christian Brévard et Jean-Yves Fraval de Bruker S.A. ainsi que M. Nadim Abou Jaoudé de Novo Nordisk S.A. pour leur soutien.

M. le Docteur Gilles Bloch m'a encadré durant ces trois années. Sa disponibilité a été constante, sa culture et sa rigueur scientifique ont su répondre à mes nombreuses questions, et il m'a largement communiqué son enthousiasme pour les progrès de la spectroscopie RMN. Je lui suis profondément reconnaissant pour la formation à la recherche qu'il a su me donner.

MM. les Professeurs Michel Décorps et Jean-Michel Franconi ont bien voulu être les rapporteurs scientifiques de ce travail malgré leur charge de travail importante. Je leur suis reconnaissant du temps et de l'énergie qu'ils ont consacrés à cette évaluation.

Je remercie M. le Professeur Yves Samson d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Les discussions que nous avons eues m'ont permis de prendre du recul par rapport à mon travail.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à MM. les Docteurs Andreas Volk et Didier Wecker pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

M. le Docteur Denis Le Bihan a été le premier à m'accueillir dans son équipe et m'a encouragé à m'inscrire au DEA de Neurosciences après Supélec. Ce fut une excellente idée et je l'en remercie sincèrement. J'exprime également ma gratitude à Mme le Professeur Marie-Jo Besson pour m'avoir accueilli dans son DEA.

Cette thèse n'est pas le fruit d'un travail solitaire et a largement bénéficié de nombreuses discussions et collaborations avec d'autres chercheurs. Je tiens à remercier tout

particulièrement Pierre-François van de Moortele pour son aide respiratoire (!), Philippe Hantraye et Emmanuel Brouillet pour m'avoir initié aux secrets du 3-NP, Ronan Roussel qui m'a transmis son savoir-faire chirurgical chez le rat, Françoise Vaufrey pour la RMN haute-résolution et pour son aide précieuse pendant les expériences *in vivo*, Caroline Dautry pour sa collaboration stimulante, et Eric Giacomini dont les talents en RF et bricolage sont irremplaçables. Je remercie également Pierre Carlier, Patrick Le Roux et Franek Hennel pour m'avoir fait profiter de leurs compétences au cours de nombreuses discussions, Françoise Condé et Nicolas Bizat pour leurs utiles conseils, Michèle Ottaviani et Christine Coulon pour leurs coups de main, Frédéric Sergent et Christophe Jouy pour la gestion quotidienne de l'animalerie, ainsi que Marie-Laure Manenti pour son efficacité dans les dédales administratifs du CEA.

La bonne ambiance dans laquelle s'est déroulée cette thèse doit beaucoup aux autres thésards et jeunes chercheurs. Merci à Anne, Isabelle, Jessica, Ronan, Nicolas, Carole, Jean-François, Jean-Baptiste, Rémi et les autres pour les nombreux cafés, rires et discussions souvent très peu scientifiques... Bon courage aux nouveaux venus, Carlos et Steren. Un grand merci à Vincent Lebon qui, fraîchement rentré des Etats-Unis, a fourni une aide précieuse pour les dernières manips, et relu l'ensemble du manuscrit jusqu'à la dernière minute. Sa bonne humeur et son humour me manqueront certainement.

La thèse constitue une étape importante qui termine la période de formation et débute la carrière de chercheur. Elle concrétise pour moi l'envie profonde de travailler à la frontière de ces deux sciences passionnantes que sont la physique et la biologie. Je remercie mes parents et ma famille pour m'avoir donné la chance de poursuivre des études longues et de m'avoir soutenu dans les difficultés de santé que j'ai traversées avant la thèse. Merci également à tous mes amis. Ils se reconnaîtront sans qu'il soit besoin de les nommer et savent ce que je leur dois.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	5
Introduction.....	7
Première partie. Développements méthodologiques.....	11
I.1. Correction en temps réel de la fréquence.....	13
I.1.1. Introduction : importance de la stabilité de fréquence pour la spectroscopie RMN du proton.....	13
I.1.2. Principe, matériels et méthodes.....	18
I.1.3. Résultats.....	25
I.1.4. Discussion.....	31
I.1.5. Conclusion.....	36
I.2. Détection séparée en proton du [4-¹³C]glutamate et du [3-¹³C]glutamate : POCE semisélectif.....	37
I.2.1. Introduction : spectroscopie ¹³ C et métabolisme du glucose.....	37
I.2.2. Détection des métabolites marqués au ¹³ C dans le cerveau par spectroscopie RMN : revue des techniques existantes.....	41
I.2.2.1. Détection à la fréquence du ¹³ C.....	41
I.2.2.2. Détection indirecte des protons couplés au ¹³ C.....	46
I.2.2.3. La méthode Proton-Observed Carbon-Edited (POCE).....	51
I.2.3. POCE semisélectif : théorie.....	41
I.2.4. Matériels et méthodes.....	66
I.2.5. Résultats.....	71
I.2.5.1. Validation <i>in vitro</i>	71
I.2.5.2. Validation <i>in vivo</i>	72
I.2.6. Discussion.....	75
I.2.7. Conclusion.....	79
I.3. Edition du GABA sans contamination par les macromolécules.....	81
I.3.1. Introduction : mesure du GABA par spectroscopie RMN.....	81
I.3.2. Revue des techniques existantes.....	83
I.3.2.1. Edition du GABA par spectroscopie différentielle.....	83

I.3.2.2. Autres approches d'édition du GABA	94
I.3.3. Edition sans contamination par les macromolécules : principe, matériels et méthodes	96
I.3.3.1. Principe.....	96
I.3.3.2. Synthèse de l'impulsion sélective d'édition	97
I.3.3.3. Coupure de l'impulsion SLR par l'impulsion semisélective 2-2 : simulation....	100
I.3.3.4. Spectroscopie RMN	103
I.3.4. Résultats	105
I.3.4.1. Validation <i>in vitro</i>	105
I.3.4.2. Validation <i>in vivo</i>	106
I.3.5. Discussion et conclusion	106

Deuxième partie. Application au modèle animal 3-NP de la maladie de Huntington..... 109

II.1. Le modèle 3-NP de la maladie de Huntington111

II.2. Spectroscopie proton simple et modèle 3-NP115

II.2.1. Introduction

II.2.2. Spectroscopie *in vivo* chez le rat et le primate à 3 Tesla : matériels et méthodes

II.2.3. Première étude : le NAA comme marqueur réversible de dysfonctionnement neuronal

II.2.4. Deuxième étude : effet d'une supplémentation en créatine chez le rat et le primate

II.3. Mesure de la vitesse du cycle de Krebs après une intoxication aiguë au 3-NP chez le rat139

II.3.1. Introduction

II.3.2. Matériels et méthodes.....

II.3.3. Résultats

II.3.4. Discussion et conclusion

Conclusion générale 139

Publications..... 165

Références bibliographiques 166

Introduction

La Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (Spectroscopie RMN) est une technique non-invasive d'analyse chimique. Malgré sa faible sensibilité, elle constitue un outil unique pour l'étude *in vivo* de la biochimie et du métabolisme du cerveau. Il s'agit d'une méthode de mesure globale : le volume de détection englobe au minimum des centaines de milliers de neurones appartenant à plusieurs types différents, ainsi que des cellules gliales. La mesure biochimique ainsi réalisée se situe donc à l'échelle macroscopique. Malgré ce caractère macroscopique, la spectroscopie RMN permet d'étudier des phénomènes neurochimiques qui se déroulent à l'échelle moléculaire tels que l'inhibition d'une enzyme, la biosynthèse le long d'une voie métabolique particulière, ou encore les échanges de substrats entre les neurones et la glie.

Le caractère non-invasif de la technique est un avantage important pour l'étude du cerveau. En effet, même si beaucoup de questions liées au métabolisme cérébral peuvent être étudiées chez l'animal sur des tranches de cerveau ou des cultures cellulaires, un certain nombre de caractéristiques peuvent difficilement être reproduites *in vitro*. En particulier, la régulation du métabolisme cérébral dépend de manière critique du microenvironnement constitué par la barrière hématoencéphalique et des interactions fonctionnelles entre les neurones et la glie. De plus, la spectroscopie RMN, tout comme la tomographie par émission de positons (TEP), est utilisable chez l'homme. Ces deux techniques ne sont d'ailleurs pas exclusives, mais plutôt complémentaires. La TEP offre une résolution spatiale inégalée pour l'imagerie des récepteurs avec des radioligands. En revanche, la spécificité chimique de la spectroscopie RMN permet de détecter plusieurs métabolites simultanément, ce qui est impossible en TEP à cause de la non-spécificité de la radioactivité.

La spectroscopie RMN du cerveau n'a cessé de se développer depuis une vingtaine d'années. L'apparition d'aimants à champ de plus en plus élevé a considérablement amélioré la résolution spectrale et le rapport signal-sur-bruit des spectres [Gruetter-1998c]. L'électronique de détection des spectromètres et les gradients utilisés pour la localisation sont devenus plus performants. De nouvelles séquences RMN ont été développées pour améliorer la localisation

spatiale et la spécificité chimique des signaux mesurés. Enfin, des techniques de quantification introduisant de la connaissance a priori se sont développées. Grâce à ces progrès, le nombre de métabolites détectables a augmenté et leur quantification est devenue plus précise. A très haut champ, il est possible aujourd'hui d'obtenir un véritable profil neurochimique d'une région donnée du cerveau [Pfeuffer-1999b].

L'objectif de cette thèse était de développer la spectroscopie RMN du cerveau sur l'aimant Bruker à 3 Tesla du SHFJ et d'appliquer ces développements à l'étude *in vivo* du modèle animal 3-NP (3-nitropropionate) de la maladie de Huntington, en collaboration avec P. Hantraye et E. Brouillet (URA CEA-CNRS 2210) qui ont développé et utilisé ce modèle chez le rat et le primate. La maladie de Huntington et le modèle animal 3-NP se caractérisent notamment par une dégénérescence du striatum et les choix méthodologiques effectués devaient permettre d'obtenir des spectres dans cette structure profonde du cerveau.

Ce mémoire est divisé en deux parties. La première partie présente les développements méthodologiques en spectroscopie RMN, la seconde les applications au modèle animal 3-NP de la maladie de Huntington. Les développements méthodologiques ont été menés dans trois directions : qualité de la spectroscopie proton de base, mesure du métabolisme oxydatif du glucose, mesure de la concentration de GABA.

Le premier objectif méthodologique (Chapitre I.1.) a été d'obtenir une spectroscopie proton directe de bonne qualité, préalable indispensable au développement de techniques plus sophistiquées. Cette spectroscopie simple permet de mesurer essentiellement trois métabolites : la choline, la créatine et le N-acétyl-aspartate (NAA). Pour améliorer la largeur de raie des spectres, nous avons décidé de mettre en oeuvre la méthode FASTMAP qui permet d'optimiser automatiquement l'homogénéité du champ magnétique. Comme il ne s'agit pas d'une technique nouvelle, sa mise en oeuvre ne sera pas décrite ici. Cependant, à cause d'un défaut de conception de l'aimant, l'utilisation de FASTMAP entraîne une dérive de fréquence et nous avons été amenés à concevoir une nouvelle méthode de correction en temps réel de la fréquence. Finalement, des spectres de bonne qualité et robustes ont été obtenus chez le singe et chez le rat, même en présence d'une dérive de fréquence de l'aimant.

De nombreux résultats récents associent la maladie de Huntington à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique. En particulier, le 3-NP inhibe la succinate déshydrogénase, une des enzymes du cycle de Krebs, et l'injection chronique de 3-NP chez

l'animal reproduit de manière frappante les symptômes et la dégénérescence neuronale de la maladie de Huntington. Notre deuxième objectif méthodologique (Chapitre II.2.) a donc été de mesurer *in vivo* le métabolisme oxydatif du glucose dans le cerveau en utilisant du glucose marqué au carbone 13 (^{13}C). Dans ce but, nous avons développé une nouvelle technique qui permet de mesurer séparément et simultanément le marquage des carbones 3 et 4 du glutamate à partir du glucose à 3 T avec la sensibilité du proton.

Enfin, la maladie de Huntington se caractérise par une dégénérescence sélective des neurones GABAergiques dans le striatum. Nous avons voulu développer une technique de mesure de la concentration de GABA dans le but de suivre cette neurodégénérescence. Notre méthode, inspirée de celle mise au point à l'université de Yale, permet de supprimer directement la contamination du signal de GABA par celui des macromolécules (Chapitre I.3.).

La deuxième partie présente l'application de ces différents outils méthodologiques à l'étude de la physiopathologie du modèle animal 3-NP de la maladie de Huntington, en collaboration avec l'équipe de l'URA CEA-CNRS 2210. Le Chapitre II.1. décrit brièvement les principales caractéristiques de la maladie de Huntington et l'intérêt du modèle animal 3-NP. Le chapitre II.2. décrit deux applications de la spectroscopie proton simple pour l'étude de modèles animaux 3-NP. La première étude mesure les modifications biochimiques induites dans le cerveau de rat et de singe par une intoxication systémique au 3-NP, la seconde étude analyse les effets d'une supplémentation en créatine. Enfin, le chapitre II.3. présente des mesures, par marquage isotopique au ^{13}C , de l'effet du 3-NP sur la vitesse du cycle de Krebs cérébral chez le rat.

Première partie

Développements méthodologiques

I.1. Correction en temps réel de la fréquence

I.1.1. Introduction : importance de la stabilité de fréquence pour la spectroscopie RMN du proton

A cause de la faible dispersion spectrale du spectre proton (environ 10 ppm) et de la faible sensibilité de la spectroscopie RMN, le nombre de métabolites détectables sur un spectre RMN du proton et la fiabilité de leur quantification dépendent de la résolution spectrale et du rapport signal-sur-bruit des spectres obtenus. Ces caractéristiques sont déterminées en premier lieu par l'intensité du champ magnétique principal B_0 et ceci justifie la recherche de champs toujours plus élevés pour la spectroscopie : des systèmes horizontaux à 11,7 T pour le petit animal et à 7 et 8 T pour l'homme ont été installés récemment aux Etats-Unis.

Pour un champ magnétique B_0 donné, la qualité du spectre dépend de manière cruciale de l'homogénéité du champ dans le volume d'intérêt. Plus le champ est homogène, plus la largeur de raie diminue et plus le rapport signal-sur-bruit augmente. En pratique, le champ magnétique n'est jamais complètement homogène, d'une part à cause des imperfections de l'aimant, mais surtout parce que la présence à l'intérieur de l'aimant d'un échantillon de susceptibilité magnétique variable modifie les lignes de champ. Pour cette raison, l'homogénéité du champ est optimisée à chaque expérience grâce à des bobines correctrices (dites aussi bobines de "shim") dont la géométrie est choisie pour que chacune génère une harmonique sphérique du champ magnétique [Chmurny-1990]. La procédure d'homogénéisation du champ consiste idéalement à annuler toutes les harmoniques du champ magnétique sauf l'harmonique d'ordre zéro, qui est constante. La plupart des aimants sont équipés de bobines générant les harmoniques d'ordre un (X, Y, Z) et deux (Z^2 , X^2-Y^2 , ZX, ZY, 2XY). Parfois les bobines d'ordre trois sont également disponibles.

L'optimisation manuelle des bobines d'ordre deux est quasiment impossible en spectroscopie localisée lorsque le volume d'intérêt n'est pas situé au centre de l'aimant, en raison du couplage entre les bobines d'ordre deux et les bobines linéaires [Hoult-1987].

L'ajustement manuel par maximisation de l'aire du signal RMN se limite donc habituellement aux bobines linéaires X, Y, Z et parfois à la bobine Z^2 . Des techniques d'optimisation automatiques ont été proposées pour ajuster efficacement toutes les bobines d'ordre deux, et trois si elles existent. L'ajustement de ces bobines d'ordre non linéaire devient d'autant plus nécessaire que le champ est élevé, car les distorsions de champ induites par les variations de susceptibilité de l'échantillon augmentent avec le champ.

Parmi les techniques d'optimisation automatique de l'homogénéité du champ, FASTMAP se distingue par sa rapidité. L'optimisation de toutes les bobines de correction avec cette méthode ne demande qu'une à deux minutes [Gruetter-1993; Shen-1997]. Sa dernière version, qui utilise une acquisition écho-planar (FASTESTMAP), permet même d'optimiser l'homogénéité du champ en quelques secondes [Gruetter-2000]. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre en œuvre FASTMAP sur le système corps entier à 3 T du SHFJ. L'utilisation de FASTMAP permet d'obtenir une largeur de raie de l'eau *in vivo* à 3 T de 6 à 7 Hz en spectroscopie localisée, soit environ 0,05 ppm. A 9,4 T, des largeurs de raie de 0,015 ppm ont été rapportées [Gruetter-1998c].

L'amélioration de la résolution spectrale impose une très grande stabilité du champ magnétique B_0 , ou de manière équivalente de la fréquence du spectromètre. Cette stabilité est indispensable pour trois raisons. Tout d'abord, une dérive de la fréquence pendant une accumulation entraîne inévitablement un élargissement des raies. Ensuite, la stabilité de fréquence est nécessaire pour obtenir une efficacité constante des impulsions sélectives en fréquence utilisées pour la suppression du pic de l'eau (par exemple CHESS) ou dans les techniques d'édition. Enfin, une dérive de fréquence même faible entraîne des artefacts de soustraction pénalisants pour la spectroscopie par différence.

Les spécifications des aimants supraconducteurs utilisés pour la spectroscopie RMN garantissent en général une dérive maximale de la fréquence de 0,1 ppm/heure. Pour les durées d'acquisition courantes en spectroscopie RMN (quelques minutes), la dérive de fréquence totale pendant l'accumulation d'un spectre reste faible par rapport à la largeur de raie. Cependant, la fréquence doit être ajustée plusieurs fois par heure lors d'accumulations prolongées. La plupart du temps, cet ajustement de fréquence est réalisé entre deux accumulations successives. Cette interruption de l'acquisition représente une perte de temps et

peut être difficile à gérer dans des expériences d'imagerie de déplacement chimique ou de spectroscopie 2D qui peuvent durer plusieurs dizaines de minutes.

Ce problème d'ajustement de la fréquence devient critique dans le cas où la fréquence dérive plus rapidement que prévu dans les spécifications. Cette dérive anormale de la fréquence peut être liée à une cause perturbatrice extérieure telle que le mouvement d'une masse métallique importante à proximité de l'aimant, à un défaut de la bobine supraconductrice, ou à une variation de température des barreaux de correction passive de l'homogénéité du champ. Ces barreaux constitués d'un matériau ferromagnétique sont installés de façon permanente dans l'aimant pour rendre le champ B_0 le plus homogène possible dès la construction de l'aimant, par opposition aux bobines de correction active décrites plus haut qui servent à homogénéiser le champ à chaque expérience.

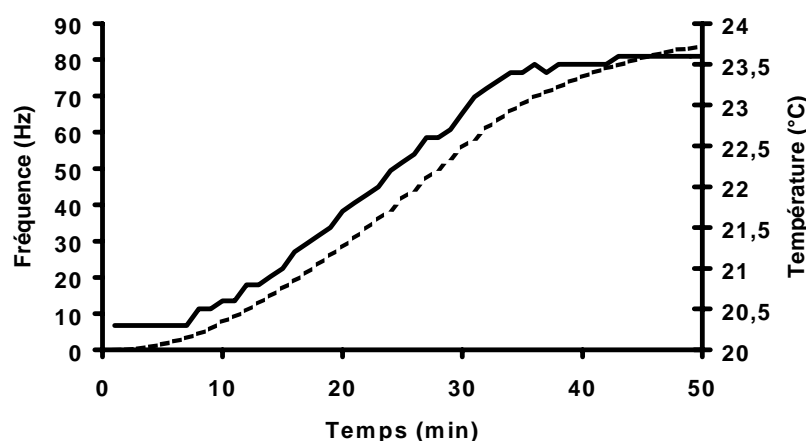


Figure 1. Mesure simultanée de dérive de fréquence et de dérive de température de l'aimant à 3 T du SHFJ. La température a été mesurée à l'aide d'un thermocouple à proximité des barreaux de correction passive et la fréquence a été mesurée sur le signal de l'eau d'un fantôme. La dérive de fréquence (en trait plein) suit le même déroulé temporel que la dérive de température (en trait discontinu) et atteint 25 Hz/°C.

Cette variation de température des barreaux de correction passive a été la motivation initiale pour développer une technique de correction de fréquence. Il est apparu en effet que l'utilisation de FASTMAP sur l'aimant à 3 T du SHFJ provoquait une dérive importante de la fréquence pouvant atteindre 2 Hz/minute, soit 1 ppm/heure, valeur dix fois supérieure aux spécifications. La dérive était d'autant plus importante que la valeur cumulée des courants appliqués aux bobines d'ordre deux était élevée. La Figure 1 montre que la dérive de fréquence est liée à une dérive thermique de l'aimant. L'application de courants élevés dans les bobines d'ordre deux entraîne un échauffement de l'aimant par effet Joule qui se transmet

aux barreaux de correction passive situés à proximité (voir Figure 2). La dérive de fréquence est due à la modification des propriétés ferromagnétiques des barreaux de correction passive avec la température. Une dérive de fréquence similaire a d'ailleurs été obtenue en augmentant artificiellement la température de l'aimant par échauffement des bobines de gradient, en appliquant des impulsions de gradient intenses et répétées rapidement. Il faut souligner que les spécifications des aimants sont généralement garanties avec tous les courants de correction à zéro, et que que les corrections de champ d'ordre linéaire (X, Y, Z) sont appliquées directement sur les bobines de gradients. Ceci explique que la dérive de fréquence provoquée par la dérive thermique de l'aimant n'est devenue apparente qu'avec l'utilisation optimale des bobines de correction d'ordre deux, rendue possible par FASTMAP.

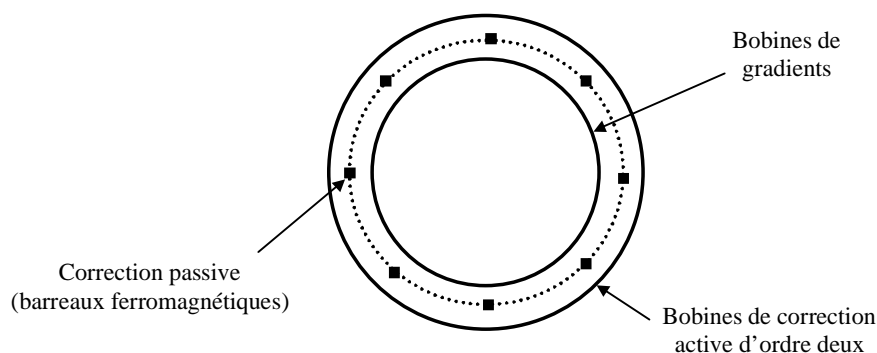


Figure 2. Coupe schématique de l'aimant à 3 T du SHFJ. La partie supraconductrice n'est pas représentée. Les barreaux de correction passive sont situés entre les bobines de correction d'ordre deux et les bobines de gradients. L'application de valeurs élevées dans les bobines de correction d'ordre deux provoque un échauffement des barreaux de correction passive par effet Joule, responsable de la dérive de fréquence de l'aimant.

Une dérive de fréquence de 1 à 2 Hz par minute rend impossible une spectroscopie de bonne qualité. L'élargissement des raies et les artefacts de soustraction peuvent être corrigés en post-traitement, à condition de stocker séparément tous les signaux de décroissance d'induction libre (en anglais "free induction decay" ou fid) et de pouvoir mesurer la fréquence sur chaque spectre individuel avant sommation. Cette stratégie n'est pas applicable lorsque la localisation est réalisée en plusieurs acquisitions (ISIS) ou lorsque le rapport-signal-sur-bruit est trop faible sur une seule acquisition. En revanche, les conséquences d'une variation de la fréquence des métabolites par rapport à la fréquence d'émission RF ne peuvent pas être corrigées en post-traitement. Par exemple, si une impulsion très sélective de suppression de l'eau n'est pas appliquée exactement à la fréquence de résonance de l'eau, le pic d'eau est moins bien supprimé, et cet effet ne peut pas être corrigé a posteriori. C'est le cas également

de certaines techniques d'édition qui utilisent des impulsions très sélectives en fréquence pour détecter uniquement certains métabolites, comme l'édition séparée des satellites C3 et C4 du glutamate (voir Chapitre I.2.) ou l'édition du GABA (voir Chapitre I.3.). Nous avons ainsi été amenés à concevoir une méthode de correction, non pas a posteriori, mais en temps réel de la fréquence.

Une correction en temps réel de la fréquence existe d'ailleurs sur tous les spectromètres de haute résolution utilisés pour l'analyse chimique. Le composé à analyser est en général dissous dans un solvant deutéré. Le système mesure en permanence la fréquence du solvant, grâce à une deuxième chaîne d'acquisition spécifique à la fréquence du deutérium, et corrige la fréquence en temps réel en injectant un courant dans la bobine de correction Z^0 qui modifie uniquement la composante constante du champ B_0 . Dans cette technique, le signal de deutérium sert donc de référence de fréquence interne à l'échantillon.

En théorie, il est possible d'adapter un tel système sur un aimant corps entier pour la spectroscopie RMN du cerveau. Il suffit de placer à proximité du sujet un petit échantillon de deutérium qui servirait de référence externe de fréquence, et d'installer une antenne capable de mesurer le signal de deutérium. Cependant, cette solution se heurte à plusieurs problèmes : le coût (il faut une chaîne de réception spécifique), le positionnement de l'échantillon deutéré et de l'antenne à la fréquence du deutérium par rapport au sujet, l'interférence éventuelle de l'utilisation des gradients avec le signal de deutérium.

Nous décrivons ici une méthode de correction en temps réel de la fréquence qui fonctionne selon le même principe que le "deuterium lock" des systèmes haute-résolution, mais en utilisant le signal de l'eau tissulaire comme référence de fréquence interne à l'échantillon. Ce signal de référence de fréquence est acquis de façon entrelacée avec le signal d'intérêt en utilisant une seule chaîne d'acquisition. Cette approche exploite la possibilité offerte par les spectromètres modernes de traiter les données en temps réel et ne nécessite pas de modification significative du spectromètre.

I.1.2. Principe, matériels et méthodes

Principe

La Figure 3 montre le schéma de principe de la méthode de correction en temps réel de la fréquence qui a été développée. Le signal d'eau servant de référence pour mesurer la fréquence est acquis à chaque répétition (par souci de clarté, on emploiera parfois dans la suite le terme anglais scan pour désigner chaque répétition) en ajoutant après la séquence de spectroscopie localisée d'intérêt (PRESS, STEAM, ISIS,...) une simple séquence impulsion-acquisition non localisée à faible angle d'excitation. Un angle d'excitation faible permet d'une part de perturber le moins possible le retour à l'équilibre des aimantations de l'eau et des métabolites (relaxation T_1), d'autre part de ne pas saturer le convertisseur analogique-numérique. En effet, pour des raisons techniques, le gain de réception ne peut pas être modifié en cours d'acquisition, et le signal de référence est amplifié avec le même gain de réception que le signal de spectroscopie localisée d'intérêt.

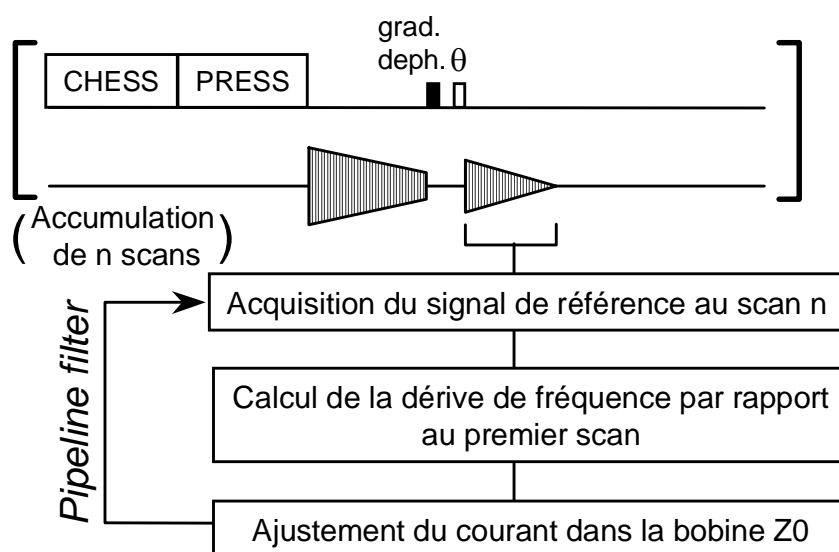


Figure 3. Schéma de principe de la méthode de correction en temps réel de la fréquence. Le signal de l'eau non localisé servant de référence de fréquence est acquis après la séquence de spectroscopie localisée grâce à une séquence impulsion-acquisition à faible angle d'excitation θ . La dérive de fréquence est calculée en temps réel à partir du signal de l'eau et corrigée par rétroaction négative sur le courant de la bobine de correction Z^0 . Un gradient déphaseur (grad. déph.) est utilisé pour éliminer tout signal avant l'émission de l'impulsion RF non localisée θ .

A partir du signal d'eau de référence, il est possible de déterminer le décalage de fréquence du scan n par rapport au premier scan du spectre en cours d'accumulation. Comme

en haute résolution, la fréquence est alors corrigée par rétroaction négative sur le courant injecté dans la bobine de correction Z^0 . Le calcul du décalage de fréquence et de la correction à appliquer se fait en temps réel à chaque répétition pendant l'accumulation du spectre. Les spectromètres Bruker Avance offrent la possibilité d'effectuer un tel traitement en temps réel en utilisant le mécanisme appelé "pipeline filter". Ce mécanisme permet de lire chaque signal RMN qui vient du récepteur immédiatement après numérisation et de le traiter par un programme utilisateur (écrit en C) avant addition aux scans précédents et stockage en mémoire. Le programme utilisateur peut soit modifier le signal (effectuer par exemple un filtrage), soit simplement en extraire une information, ce qui est le cas ici pour la fréquence du signal.

Calcul de la fréquence à partir du signal de l'eau

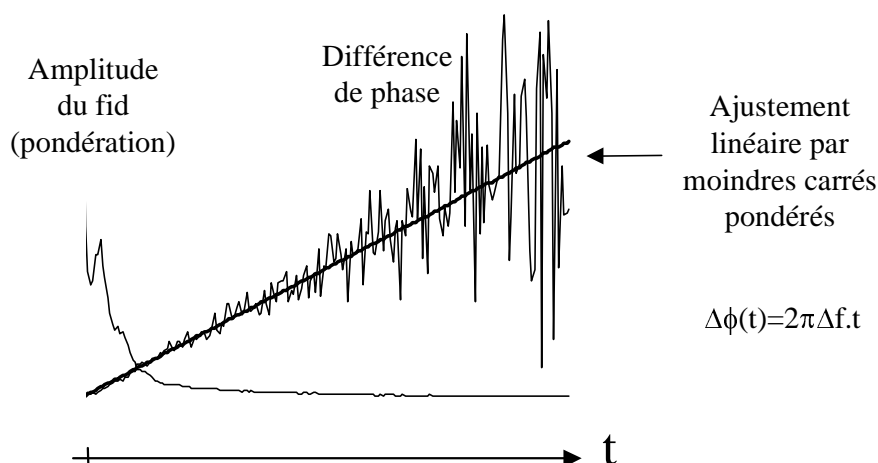


Figure 4. Calcul de la différence de fréquence entre deux acquisitions par ajustement linéaire de la différence de phase dans le domaine temporel. La différence de phase devient de plus en plus bruitée lorsque l'amplitude du signal RMN diminue. La pondération de l'ajustement linéaire de la différence de phase par l'amplitude du signal permet de réduire l'influence du bruit. La pente de l'ajustement linéaire est directement égale à la différence de fréquence Δf à un facteur 2π près.

Le décalage de fréquence est déterminé par la différence de fréquence entre le signal d'eau de référence au scan n et le signal d'eau de référence au scan 1. Il s'agit donc de calculer une différence de fréquence entre deux signaux, qui sont, si le sujet ne bouge pas, strictement identiques au décalage de fréquence près. Ce problème peut être résolu de manière très efficace directement dans le domaine temporel. D'après les propriétés de la transformée de Fourier, une différence de fréquence Δf dans le domaine fréquentiel correspond en effet à un déphasage linéaire en fonction du temps $\Delta\phi(t) = 2\pi.\Delta f.t$ dans le domaine temporel. Si les

signaux complexes en fonctions du temps $fid_1(t)$ et $fid_n(t)$ désignent respectivement le signal RMN de l'eau au scan 1 et au scan n, la différence de phase en fonction du temps entre $fid_1(t)$ et $fid_n(t)$ est donnée par : $\Delta\phi(t)=\text{atan}[fid_n(t)/fid_1(t)]$. Un ajustement par moindres carrés non récursifs permet de calculer la pente de cette droite et d'obtenir Δf (voir Figure 4).

Le rapport signal-sur-bruit des signaux $fid_1(t)$ et $fid_n(t)$ décroît au cours du temps à cause de la relaxation T_2^* . La phase du bruit étant évidemment aléatoire, le bruit de la différence de phase $\Delta\phi(t)$ augmente avec le temps (voir Figure 4). Pour réduire l'influence de ce bruit de phase, l'ajustement par moindres carrés a été pondéré par le module de l'amplitude de $fid_1(t)$. La formule classique qui donne la pente a_1 d'un ajustement linéaire d'un ensemble de points (x_i, y_i) pondérés par les coefficients w_i est :

$$a_1 = \frac{\sum_i w_i \cdot \sum_i w_i x_i y_i - \sum_i w_i x_i \cdot \sum_i w_i y_i}{\sum_i w_i \cdot \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i w_i x_i \right)^2}$$

Pour réduire encore l'influence du bruit de phase, l'amplitude moyenne du bruit a été calculée sur les 200 derniers points complexes de $fid_1(t)$ (sur un total de 512 points complexes) et tous les points dont le module était inférieur à cinq fois cette valeur-seuil n'ont pas été pris en compte pour l'ajustement (i.e. $w_i(t)=0$). A cause de ce seuil, seuls 150 points environ de la différence de phase ont été affectés d'un coefficient de pondération w_i non nul *in vivo*. Les points non pris en compte correspondent aux instants où le signal RMN devient faible par rapport au bruit. Cela ne concerne pas uniquement les points situés à la fin du signal de décroissance d'induction libre, mais également d'éventuels passages par zéros de l'intensité de ce signal à cause de phénomènes de battement de fréquence. C'est le cas par exemple si le signal d'eau non localisé se présente sous la forme d'un pseudo-doublet.

Calcul et application de la correction

La correction de fréquence appliquée au scan numéro k (k entier) peut être définie dans un premier temps comme l'opposé de la fréquence du signal de l'eau mesurée au scan (k-1). Rappelons que cette fréquence du signal de l'eau est mesurée par rapport au premier scan de l'accumulation en cours. Si $f(k)$ désigne la fréquence du signal d'eau avant correction au scan k, $\Delta f(k)$ la correction appliquée au scan k et $f'(k)$ la fréquence du signal de l'eau après correction au scan k, on a :

$$f'(k) = f(k) + \Delta f(k) = f(k) - f(k-1)$$

Comme la fréquence du signal de l'eau est mesurée à chaque répétition, $f(k)$ et $f'(k)$ peuvent être considérés comme des signaux discrets en fonction de k , dont on peut calculer la variance σ et σ' respectivement. Si la distribution des fluctuations de fréquence suit une loi normale, on peut écrire :

$$\sigma'^2 = \sigma^2 + \sigma^2 = 2\sigma^2$$

Par conséquent, l'application de la correction augmente la variance des fluctuations de fréquence d'un facteur 2. Pour limiter cette augmentation de la variance, la correction peut être lissée en moyennant les N mesures de fréquence précédentes, où N est un paramètre à déterminer, soit :

$$\Delta f(k) = -\frac{1}{N} [f(k-1) + f(k-2) + \dots + f(k-N)]$$

La fréquence après correction est alors donnée par :

$$f'(k) = f(k) - \frac{1}{N} [f(k-1) + f(k-2) + \dots + f(k-N)]$$

La variance de la fréquence après correction devient :

$$\sigma'^2 = \sigma^2 + \frac{\sigma^2}{N} = \left(1 + \frac{1}{N}\right) \cdot \sigma^2$$

Plus N est grand, moins la variance est dégradée par la correction de fréquence. Si $N=4$, la variance n'est plus dégradée que d'un facteur 1,25. Cependant, N ne doit pas être choisi trop grand pour ne pas introduire un retard trop important dans le temps de réaction de la correction lors d'une variation accidentelle brusque de la fréquence (mouvement du sujet par exemple). Des valeurs de N comprises entre 4 et 8 représentent un bon compromis. Comme cela sera expliqué plus loin, le choix de N est compliqué en spectroscopie cérébrale *in vivo* par les effets de la respiration.

Une fois la correction de fréquence calculée, il reste à déterminer la valeur du courant à injecter dans la bobine Z^0 pour appliquer cette correction. Ce courant est déterminé sur le

système Bruker par une valeur de correction Z^0 comprise entre -100% et 100% avec une précision de 0,1%. La valeur 100% correspond au courant maximal délivré par l'alimentation soit 5 A. Par ailleurs, le plus petit incrément de fréquence, obtenu en augmentant de 0,1% la valeur du shim Z^0 , était initialement trop élevé pour permettre d'appliquer de petites corrections de fréquence. Afin de réduire cette valeur, un diviseur de courant constitué de deux résistances a été ajouté en sortie de l'alimentation : une résistance de 22 Ω a été placée en série avec la bobine Z^0 et une résistance de 1 Ω a été placée en parallèle pour dériver la plus grande partie du courant. De cette façon, l'incrément de fréquence minimal a été ramené à 0,05 Hz environ. Il s'agit de la seule modification matérielle apportée au spectromètre pour la méthode de correction de fréquence en temps réel.

Le temps nécessaire pour appliquer la correction est la somme du temps de prise en compte par le spectromètre de la commande de courant dans la bobine Z^0 ($t_{\text{comm}}=800$ ms) et du temps de stabilisation du courant ($t_{\text{stab}}=400$ ms), soit un temps minimum de 1,2 seconde. Le temps t_{comm} d'envoi de la commande peut certainement être considérablement diminué en modifiant l'interface de communication entre la console d'acquisition et l'électronique du spectromètre. En ajoutant à t_{comm} et t_{stab} le temps nécessaire à la séquence de spectroscopie localisée (250 ms), le temps d'acquisition (512 ms) et le temps de calcul de la fréquence (50 ms), le temps de répétition minimum est d'environ 2 s, valeur suffisamment faible pour la plupart des acquisitions de spectroscopie localisée.

Enfin, il faut mentionner un problème potentiel dans l'utilisation de la bobine Z^0 : celle-ci est en général déjà utilisée pour corriger les courants de Foucault générés par les commutations des gradients ("preemphasis"). Ceci n'a pas posé de problème car l'aimant à 3 T d'Orsay comporte deux bobines de correction Z^0 : l'une intégrée dans l'aimant (inutilisée jusqu'alors), et l'autre dans le tuyau de gradient (utilisée pour la correction des courants de Foucault). Nous avons donc simplement tiré parti de la bobine Z^0 inutilisée pour corriger la dérive de fréquence. Cependant, pour les systèmes ne disposant que d'une seule bobine Z^0 , il suffit en principe de connecter sur la même bobine Z^0 l'alimentation des "preemphasis" et l'alimentation des bobines de correction de champ.

Simulation des conséquences de la respiration

Lorsque le bruit de mesure de la fréquence du signal de l'eau est aléatoire, le moyennage effectué pour calculer la correction de fréquence réduit la variance de la correction d'un facteur $1/N$. Cependant, les mesures effectuées chez l'homme (voir résultats page 28) mettent en évidence une composante oscillatoire induite par la respiration. Cette composante périodique n'est pas moyennée de la même façon que la composante aléatoire, et peut même être amplifiée par ce moyennage. Le but de ce paragraphe est d'analyser l'effet de la respiration sur la correction de fréquence.

On veillera dans la suite à ne pas confondre la fréquence du signal de l'eau avec la fréquence de l'oscillation respiratoire. La fréquence du signal de l'eau est mesurée régulièrement à intervalle de temps TR et constitue un signal discret $f(k)$. Ce signal $f(k)$ possède lui-même une composante respiratoire pseudo-sinusoïdale avec une certaine fréquence. Nous parlerons donc de fréquence de l'eau pour désigner le signal $f(k)$ et de fréquence respiratoire pour désigner la fréquence de la composante sinusoïdale de $f(k)$.

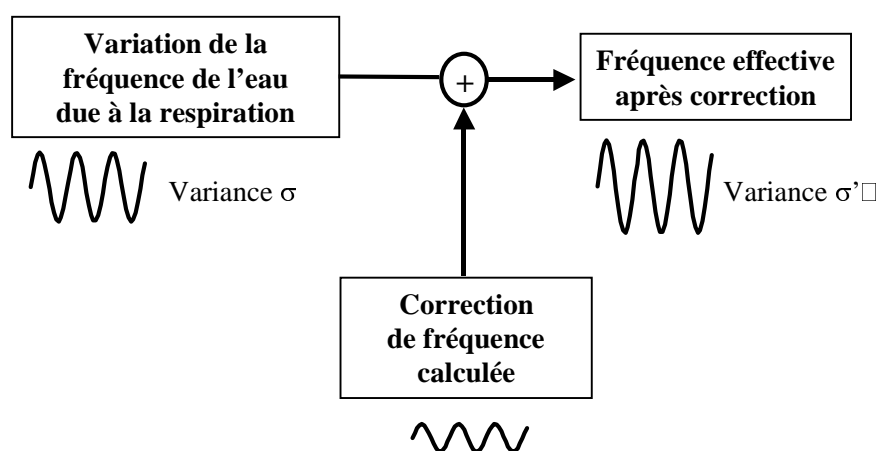


Figure 5. Risque d'amplification des effets de la respiration par la correction de fréquence. Lorsque la fréquence du signal de l'eau varie de façon sinusoïdale à cause de la respiration, la correction de fréquence calculée est elle-même sinusoïdale. La fréquence du signal de l'eau après correction est donc la somme de deux sinusoïdes. Suivant la phase relative de ces deux sinusoïdes, la variance σ' de la variation de fréquence après correction peut être supérieure ou inférieure à la variance σ de la variation de fréquence avant correction.

Supposons que la respiration induise une oscillation sinusoïdale de la fréquence du signal de l'eau : $f(k) = \cos(\omega \cdot TR \cdot k)$ avec $\omega = 2\pi f_{\text{resp}}$, où k désigne le numéro du scan de l'acquisition en cours, TR le temps de répétition et f_{resp} la fréquence respiratoire. Dans ce cas la correction sera également sinusoïdale car il s'agit de la convolution de la fréquence avant

correction $f(k)$ avec un noyau rectangulaire. La fréquence résultante sera donc la somme de deux signaux sinusoïdaux. Suivant la phase relative de ces deux sinusoïdes, l'amplitude des oscillations pourra être augmentée ou diminuée (Figure 5).

Ce risque d'amplification de la sinusoïde respiratoire est évident dans le cas où la correction n'est pas lissée ($N=1$). Supposons en effet que $T_{\text{resp}}=1/f_{\text{resp}}=2 \cdot \text{TR}$ (par exemple $T_{\text{resp}}=4$ s et $\text{TR}=2$ s). On a alors $f(k)=\cos(\pi k)$ et $f'(k)=f(k)-f(k-1)=2\cos(\pi k)$. Autrement dit, la sinusoïde respiratoire est multipliée par deux à cause de la correction de fréquence, ce qui correspond à une variance multipliée par 4.

Calculons maintenant la fréquence après correction dans le cas $N=4$. On notera dans la suite $\omega'=\omega \cdot \text{TR}$:

$$\begin{aligned} f'(k+4) &= f(k+4) - \Delta f(k+4) \\ &= \cos(\omega'(k+4)) - \frac{1}{4} [\cos(\omega'k) + \cos(\omega'(k+1)) + \cos(\omega'(k+2)) + \cos(\omega'(k+3))] \\ &= \cos(\omega'k)\cos(4\omega') - \sin(\omega'k)\sin(4\omega') - \frac{1}{4} [\cos(\omega'k) + \cos(\omega'k)\cos(\omega') - \sin(\omega'k)\sin(\omega') \\ &\quad + \cos(\omega'k)\cos(2\omega') - \sin(\omega'k)\sin(2\omega') + \cos(\omega'k)\cos(3\omega') - \sin(\omega'k)\sin(3\omega')] \\ &= \cos(\omega'k) \cdot \left(\cos(4\omega') - \frac{1}{4} [1 + \cos(\omega') + \cos(2\omega') + \cos(3\omega')] \right) \\ &\quad - \sin(\omega'k) \cdot \left(\sin(4\omega') - \frac{1}{4} [\sin(\omega') + \sin(2\omega') + \sin(3\omega')] \right) \end{aligned}$$

Pour $N=6$, on obtient de la même façon :

$$\begin{aligned} f'(k+6) &= \cos(\omega'k) \cdot \left(\cos(6\omega') - \frac{1}{6} [1 + \cos(\omega') + \cos(2\omega') + \cos(3\omega') + \cos(4\omega') + \cos(5\omega')] \right) \\ &\quad - \sin(\omega'k) \cdot \left(\sin(6\omega') - \frac{1}{6} [\sin(\omega') + \sin(2\omega') + \sin(3\omega') + \sin(4\omega') + \sin(5\omega')] \right) \end{aligned}$$

Finalement, la fréquence après correction est de la forme :

$$f'(k+N) = A \cos(\omega \cdot \text{TR} \cdot k) + B \sin(\omega \cdot \text{TR} \cdot k)$$

Les coefficients A et B dépendent de N , f_{resp} et TR . Suivant les valeurs de A et B , la variance du signal $f'(k)$ après correction peut être augmentée ou diminuée par rapport à la variance du signal $f(k)$ avant correction.

Validation in vitro et in vivo.

Toutes les mesures ont été effectuées dans l'aimant corps-entier à 3 T. Le tunnel de gradient corps entier avec une intensité maximale de 10 mT/m et un temps de montée de 600 μ s a été utilisé. Le temps d'acquisition total était de 512 ms (1024 points complexes, largeur de bande 2000 Hz). Pour des raisons techniques, le temps d'acquisition n'a pas été interrompu pendant l'émission de l'impulsion non localisée pour obtenir le signal d'eau de référence. La première partie du temps d'acquisition a servi à acquérir le signal de spectroscopie localisé. Une impulsion rectangulaire de 50 μ s précédée d'un gradient de déphasage pour éliminer le signal localisé résiduel (5 ms, 50%) a été rajoutée 256 ms après le début du temps d'acquisition pour acquérir le signal de l'eau non localisé. En conséquence, le temps d'acquisition effectif du signal localisé était de 200 ms et celui du signal d'eau non localisé de 256 ms. L'impulsion non localisée a été calibrée pour que le signal de l'eau remplisse environ 70% de la dynamique du convertisseur analogique-numérique.

Les mesures *in vivo* sur un volontaire ont été effectuées avec la sonde en cage d'oiseau standard Bruker (sonde quadrature, longueur 25 cm, diamètre 25 cm). La tête du sujet a été fermement maintenue pour éviter tout mouvement. Les spectres ont été acquis avec une séquence entrelacée PRESS/impulsion-acquisition sur un voxel de 15 ml et avec un TR de 2 s ou 3 s. L'homogénéité du champ a été optimisée avec FASTMAP pour obtenir une largeur de raie de 6-7 Hz sur l'eau. L'utilisation de FASTMAP a entraîné une dérive de fréquence de l'ordre de 1 Hz par minute par échauffement des barreaux de correction passive.

I.1.3. Résultats

Précision de la mesure de fréquence in vitro

Dans le cas d'un spectre localisé acquis *in vivo* dans le cerveau humain avec une sonde volumique, le signal d'eau non localisé servant de référence de fréquence provient de l'ensemble des tissus situés dans le volume sensible de la sonde alors que l'homogénéité du champ est optimisée sur le volume d'intérêt. Dans ce cas, la largeur de raie du signal d'eau non localisé est de l'ordre de 100 Hz. Malgré sa largeur de raie importante, la fréquence de ce signal peut être mesurée avec une grande précision comme le montre la Figure 6. Une série de

signaux d'eau de référence ont été acquis avec une séquence entrelacée PRESS/impulsion-acquisition sur un fantôme d'eau avec une largeur de raie de 90 Hz, représentative de la situation *in vivo*. La bobine de correction Z^0 a été utilisée pour faire varier la fréquence dans une gamme de quelques Hz et la fréquence du signal d'eau a été déterminée avec une des méthodes décrites ci-dessous.

Trois méthodes de calcul de la fréquence ont été comparées. La méthode A est la méthode d'ajustement linéaire de la différence de phase dans le domaine temporel décrite plus haut. Dans la méthode B, la fréquence a été déterminée par le point d'amplitude maximum du spectre en module, ce qui constitue pour un spectroscopiste la méthode de mesure de fréquence la plus intuitive. Les signaux temporels $fid_1(t)$ et $fid_n(t)$ ont été complétés par des zéros avant transformée de Fourier pour augmenter la résolution spectrale (taille du vecteur de données après ajout des zéros : SI=128k). Enfin, dans la méthode C, la fréquence a été calculée en maximisant la fonction de corrélation entre les deux spectres, après ajout de zéros (SI=128k) et transformée de Fourier. Si F_1 et F_n désignent respectivement la transformée de Fourier discrète de $fid_1(t)$ et $fid_n(t)$, la fonction maximisée s'écrit :

$$\text{corr}(k) = \sum_{i=-SI+k}^{SI-k} F_1(i) \cdot F_n(i+k)$$

où k est un entier compris entre $-SI$ et SI .

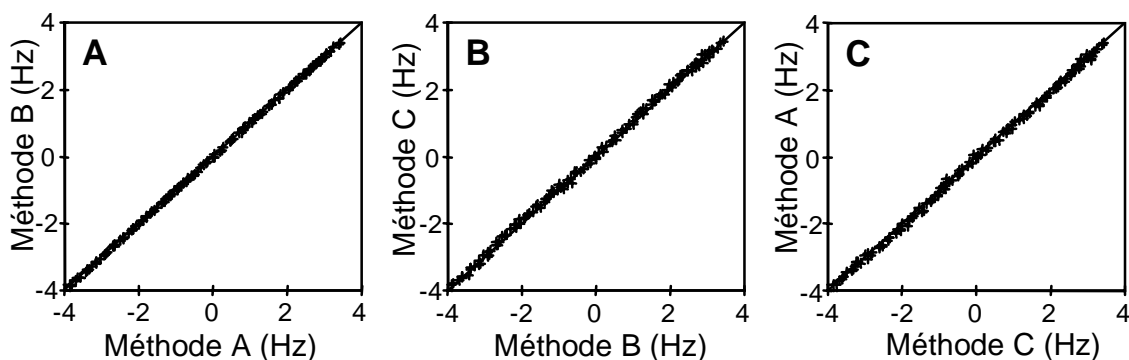


Figure 6. Comparaison des trois méthodes de mesure A, B, C pour déterminer la fréquence d'un signal d'eau non localisé d'une largeur de raie de 90 Hz environ. Un total de 128 signaux d'eau a été acquis en faisant varier la fréquence grâce à la bobine Z^0 . La différence de fréquence par rapport au premier signal acquis a été déterminée par chacune des trois méthodes. Les points expérimentaux sont représentés par des croix et la ligne diagonale représente l'identité. La précision de la mesure est excellente avec les trois méthodes malgré la largeur du pic d'eau.

L'excellente corrélation entre les trois méthodes montre que la dérive de fréquence de l'aimant peut être mesurée avec une précision inférieure à 0,1 Hz même sur un signal d'eau très large. En revanche, le temps de calcul varie beaucoup d'une méthode à l'autre. Alors que la méthode A ne requiert que 50 ms, les méthodes B et C demandent respectivement 2 s et 30 s sur la station de travail du spectromètre. Pour ces deux dernières méthodes, l'ajout de zéros au signal temporel (128k) avant transformée de Fourier pour obtenir une très bonne résolution spectrale explique le temps de calcul important, alors que la méthode A ne traite que quelques centaines de points. La méthode A semble également plus robuste que la méthode B vis-à-vis de petites déformations du signal de l'eau. Ces perturbations mineures peuvent en effet affecter le maximum d'amplitude déterminé par la méthode B, mais pas le décalage global de fréquence estimé par la méthode A.

Mesure de la fréquence in vivo sur un volontaire sain

La Figure 7a montre les variations de fréquence (sans correction) enregistrées sur la tête d'un volontaire au cours du temps. Trois composantes peuvent être distinguées : la dérive de fréquence à long-terme que l'on veut corriger, provoquée ici par l'échauffement des barreaux de correction passive de l'aimant ; la respiration du sujet qui induit une oscillation quasi-sinusoïdale de la fréquence ; et le bruit résiduel lié au cycle cardiaque et aux autres mouvements rapides. Dans ce cas particulier, à titre illustratif, le sujet respirait avec une période de 3,5 Hz en se synchronisant sur un signal sonore (généralisé à l'aide du logiciel EXPE 6), alors que le temps de répétition de la séquence était $TR=3$ s. La composante respiratoire est visible sur la transformée de Fourier (Figure 7b) sous la forme d'un pic à la fréquence 0,05 Hz. Il s'agit du repliement de la fréquence respiratoire $f=1/3,5=0,29$ Hz dans la bande passante allant de 0 à $f=1/(2 \cdot TR)=0,17$ Hz, le temps de répétition TR étant la période d'échantillonnage.

Le bruit résiduel a été isolé en supprimant la composante respiratoire dans le domaine fréquentiel (le pic à 0,05 Hz a été remplacé par ses deux plus proches voisins) et en calculant le signal temporel correspondant par transformée de Fourier inverse. Les fluctuations dues à la respiration dominent clairement la variance à court-terme de la fréquence de l'eau. Ceci est confirmé de manière quantitative en éliminant la dérive à long terme, par ajustement linéaire, sur les Figure 7a et Figure 7c. La variance de la fréquence chute de $0,143 \text{ Hz}^2$ à $0,045 \text{ Hz}^2$

quand la composante respiratoire est supprimée. Cette dernière représente donc dans ce cas précis environ les deux tiers de la variance à court-terme.

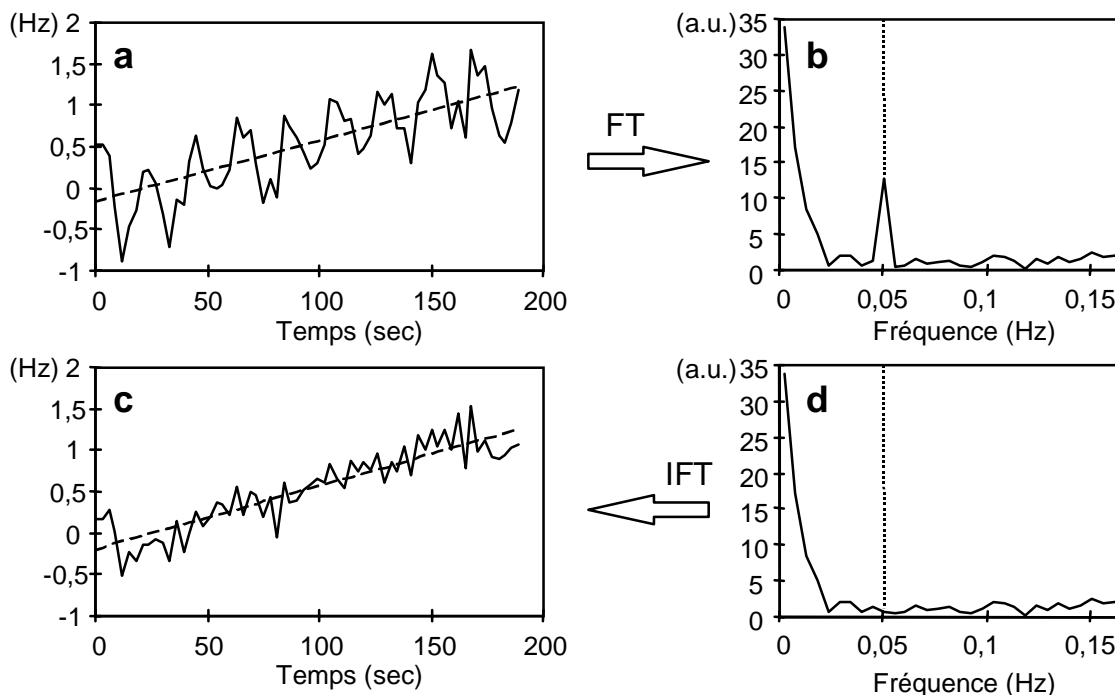


Figure 7. Décours temporel (a) et analyse de Fourier (b) de la fréquence du signal de l'eau non localisé provenant de la tête d'un volontaire, mesurée avec un TR de 3 s alors que le sujet respirait avec une période de 3,5 s. Le pic intense à 0,05 Hz en (b) correspond à la fréquence respiratoire (0,29 Hz) repliée dans la bande d'échantillonnage (0-0,17 Hz). La composante basse fréquence correspond à la dérive à long-terme, approximativement linéaire, représentée par une ligne discontinue en (a) et (c). La contribution de la respiration à la variance à court-terme du signal temporel a été estimée en annulant le pic respiratoire dans la Transformée de Fourier, remplacé par la moyenne des deux points voisins en (d), et en effectuant une Transformée de Fourier inverse (c).

Effet de la respiration : simulation

L'augmentation de variance provoquée par la correction de fréquence en présence d'une oscillation respiratoire a été simulée dans l'environnement MATLAB. Pour des valeurs données de N et TR, le rapport des variance σ'^2/σ^2 a été calculé en fonction de f_{resp} en utilisant les équations obtenues plus haut (page 24). Dans le cas N=4 et TR=3 s, la Figure 8 montre que la correction de fréquence peut dégrader la variance d'un facteur 2 si la fréquence respiratoire est égale à 0,29 Hz, valeur qui se situe dans la gamme physiologique (0,15 à 0,35 Hz). En revanche, si l'on choisit N=6 et TR=2 s, la correction de fréquence dégrade la variance d'un facteur 1,33 au maximum dans la gamme de fréquence respiratoire physiologique.

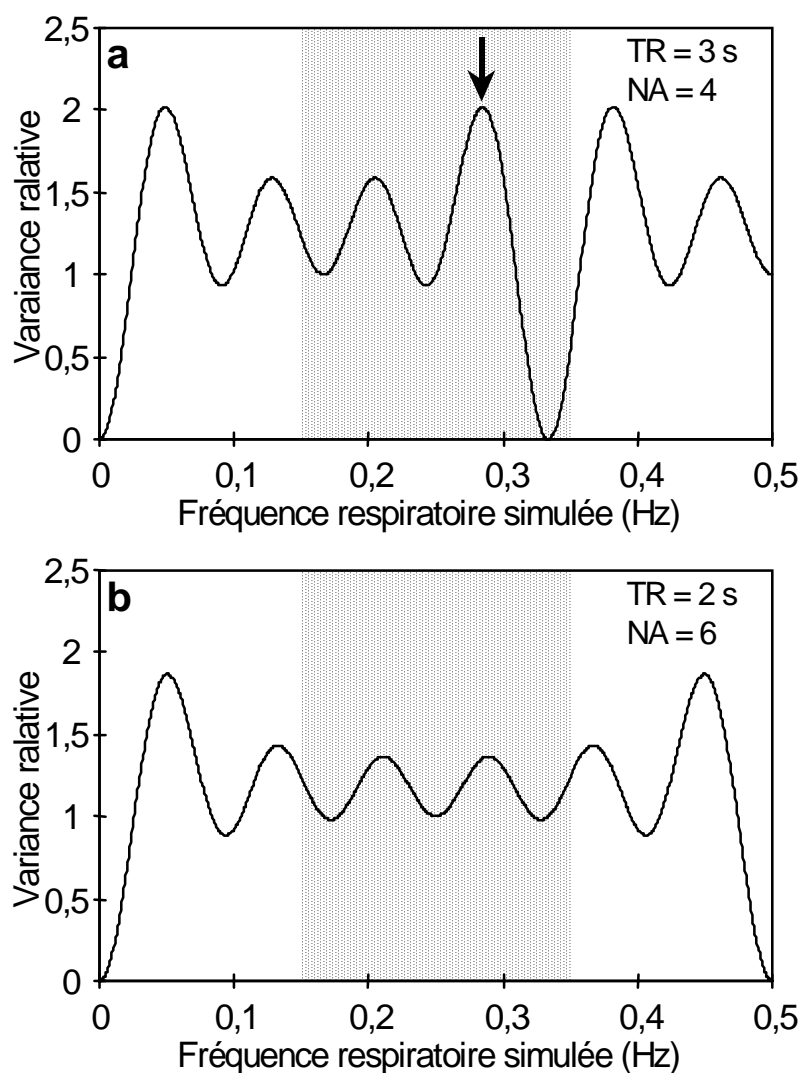


Figure 8. Simulation numérique de l'effet de la correction de fréquence sur la variance de la fréquence du signal de l'eau. La variation de la fréquence de l'eau due à la respiration a été modélisée par une sinusoïde. Le rapport de la variance avec et sans correction a été calculé dans les cas (a) $NA=4$, $TR=3$ s et (b) $NA=6$, $TR=2$ s. La région grisée correspond à la gamme de respiration physiologique humaine. La flèche en (a) indique le cas le plus défavorable choisi pour les expériences de la Figure 9.

Effets de la respiration : validation *in vitro* et *in vivo*

Le résultat des simulations a été comparé à des mesures *in vitro* sur un fantôme d'eau. Le cas le plus défavorable, correspondant à $N=4$, $TR=3$ s et $T_{\text{resp}}=3,5$ s, a été reproduit expérimentalement en appliquant la correction de fréquence alors que la fréquence de l'eau variait de manière sinusoïdale grâce à de toutes petites variations de courant dans la bobine de shim Z^2 . En effet, la bobine Z^2 est fortement couplée à la bobine Z^0 , et de petites variations de courant sont suffisantes pour faire varier la fréquence de quelques Hertz alors que la déformation des raies reste négligeable. Conformément aux résultats de la simulation, la

variance de la fréquence de l'eau après correction est le double de la variance avant correction. De même, la correction de fréquence provoque une dégradation de la variance de la fréquence de l'eau *in vivo* lorsque le sujet respire à $T_{\text{resp}}=3,5$ s grâce à un signal sonore de synchronisation. Cependant, dans ce cas, la dégradation de variance est légèrement inférieure au facteur deux prévu par la simulation, d'une part parce que la composante respiratoire n'est pas parfaitement sinusoïdale et d'autre part parce qu'il existe d'autres sources de variance à court terme que la respiration.

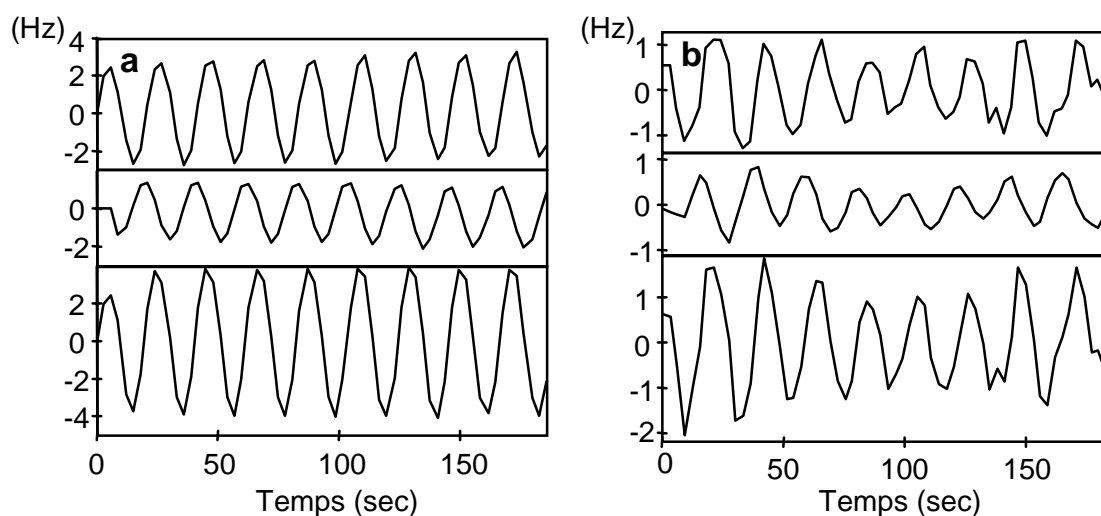


Figure 9. Démonstration *in vitro* et *in vivo* de l'effet de la correction de fréquence sur la variance du décours temporel de la fréquence de l'eau. (a) Sur un fantôme d'eau, une variation sinusoïdale de la fréquence de l'eau a été induite avec la bobine de correction Z^2 (trace du haut), alors que la correction en temps réel de la fréquence était calculée (trace du milieu) et appliquée en utilisant la bobine Z^0 . Les paramètres correspondent au cas le plus défavorable de la Figure 8a (TR 3s, NA 4, fréquence oscillatoire 0,29 Hz). La variation de fréquence après correction (trace du bas) possède une variance augmentée d'un facteur deux par rapport à la variation de fréquence spontanée, comme prédit par la simulation de la Figure 8a. (b) Décours temporel de la fréquence de l'eau sur la tête d'un volontaire respirant avec une période de $T=3,5$ s alors que la correction en de fréquence (trace du milieu) est appliquée sur la bobine Z^0 (TR 3s, NA 4). La variance de la variation de fréquence passe de $0,49 \text{ Hz}^2$ avant correction à $0,96 \text{ Hz}^2$ après correction.

Spectroscopie in vivo avec correction en temps réel de la fréquence

En pratique, il y a peu de chances d'avoir une dégradation de la fréquence aussi importante que celle prévue par la simulation dans le cas le plus défavorable, car la fréquence respiratoire d'un sujet n'est certainement pas constante pendant toute la durée d'acquisition du spectre. Cependant, pour rendre la correction de fréquence robuste dans toutes les situations, les paramètres $NA=6$ et $TR=2$ s ont été conservés pour les expériences *in vivo*.

La Figure 10 montre un ensemble de données obtenues avec et sans correction de fréquence sur un volontaire respirant normalement (sans signal sonore) alors que la fréquence de l'aimant dérivait de 1 Hz/mn à cause de l'échauffement des barreaux de correction passive. Les graphes de la Figure 10a montrent que la dérive à long-terme est bien compensée par la correction de fréquence. En revanche, la variance de la fréquence augmente très peu. Après soustraction de la dérive à long-terme, la variance de la fréquence de l'eau passe de 0,054 Hz² sans correction à 0,057 Hz² avec correction. Enfin, à cause de l'importance de la dérive à l'échelle de temps de l'acquisition du spectre (8,5 min), la correction de la dérive de fréquence entraîne une amélioration significative de la largeur de raie du spectre des métabolites acquis dans le lobe occipital avec la séquence PRESS. La largeur de raie du NAA est réduite de 2,5 Hz pour atteindre 6,5 Hz avant filtrage (Figure 10b).

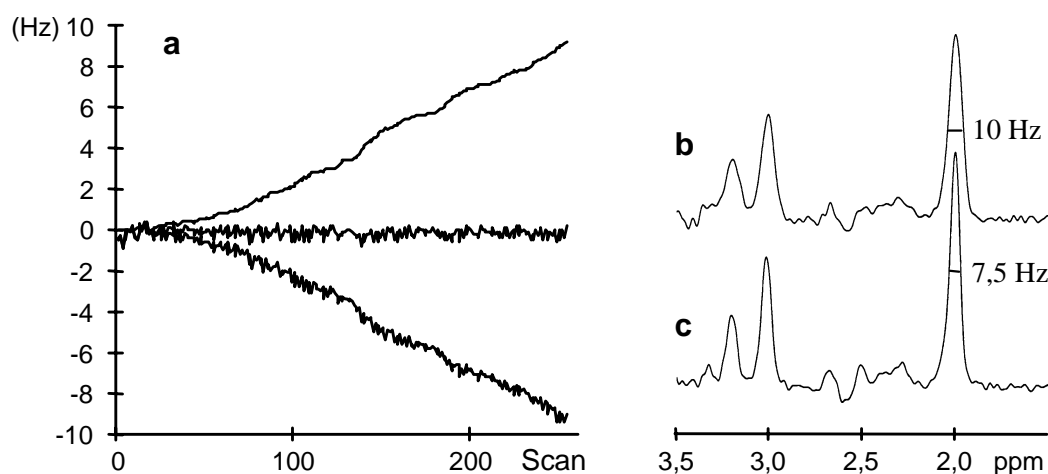


Figure 10. Données *in vivo* obtenues sur la tête d'un volontaire avec une séquence entrelacée PRESS/impulsion-acquisition (TR 2s, 256 répétitions) en présence d'une dérive rapide de l'aimant (environ 1 Hz/minute) et alors que le sujet respirait normalement (sans signal sonore de synchronisation). (a) Fréquence du signal d'eau de référence au cours du temps sans correction (trace du bas) et avec correction (trace du milieu), et correction appliquée à la bobine Z⁰ (trace du haut). (b) Spectre PRESS *in vivo* dans le lobe occipital (VOI 15 m, TE 68 ms), en présence de la dérive de fréquence montrée en (a), sans correction en temps réel de la fréquence. (c) Spectre identique au spectre montré en (b), mais avec correction en temps réel de la fréquence. Les spectres ont été traités avec un élargissement lorentzien de 1 Hz.

I.1.4. Discussion

Les résultats obtenus montrent qu'une correction en temps réel efficace de la dérive de fréquence de l'aimant peut être mise en œuvre sur un spectromètre RMN corps entier *in vivo*.

Aucune modification particulière du système n'est nécessaire. La méthode utilise la même chaîne d'acquisition pour acquérir, de façon entrelacée, les données de spectroscopie localisée d'intérêt et un signal d'eau non localisé qui sert de référence pour la mesure de la fréquence. La dérive de fréquence calculée à partir du signal de l'eau est corrigée par application d'une rétroaction négative sur le courant de la bobine de correction Z^0 . La méthode est très générale et peut s'appliquer à n'importe quelle géométrie d'antenne et n'importe quelle séquence de spectroscopie localisée à condition que le temps de répétition soit suffisamment long pour calculer et appliquer la correction. Pour les expériences nécessitant un temps de répétition plus court, comme l'imagerie de déplacement chimique, il serait possible d'appliquer la correction de fréquence à des intervalles de temps plus longs que TR.

La précision de la mesure de fréquence est déterminante pour l'efficacité de la méthode de correction. Il est a priori possible de mesurer cette fréquence directement sur le signal localisé d'intérêt (obtenu par exemple avec une séquence PRESS). Dans ce cas, l'acquisition d'un signal d'eau de référence après la séquence localisée devient inutile. Cependant, cette solution convient mal lorsque le rapport signal-sur-bruit d'un seul scan est faible (petit voxel), lorsque la localisation n'est pas réalisée en un seul scan (localisation ISIS) ou lorsque le signal varie d'un scan à l'autre (imagerie de déplacement chimique, spectroscopie 2D). L'ajout d'une séquence impulsion-acquisition avec un petit angle d'excitation permet au contraire d'acquérir un signal d'eau intense et stable tout en perturbant peu le retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale. De plus, il a été montré que la largeur importante du pic de l'eau n'empêche pas une mesure très précise de sa fréquence.

Lorsque la séquence d'impulsions de spectroscopie localisée varie d'un scan à l'autre, la mesure de fréquence sur le signal de l'eau non localisé peut malgré tout subir de légères fluctuations car l'aimantation de l'eau possède un "passé" différent avant chaque séquence impulsion-acquisition. C'est le cas par exemple de la séquence ISIS, dans laquelle la localisation est réalisée en combinant plusieurs scans et en appliquant à chaque scan une combinaison différente d'impulsions d'inversion dans chacune des trois directions de l'espace. Il y a un risque que la fréquence mesurée sur le signal d'eau non localisé fluctue de façon périodique avec une période égale à la durée du cycle d'ISIS. Bien que les données obtenues avec ISIS *in vivo* chez le singe n'aient pas mis en évidence de telles fluctuations (données non montrées), il est préférable dans cette situation de choisir N (nombre de points moyennés pour calculer la correction) égal ou multiple du nombre de scans nécessaires pour

achever un cycle complet d'ISIS, afin de ne pas propager une éventuelle oscillation de fréquence sur la correction. Par exemple, pour une séquence ISIS 3D, on choisira $N=8$.

Les fluctuations à court terme de la fréquence de l'eau provoquées par la respiration compliquent la mise en œuvre de la correction de fréquence. Tout d'abord, la composante respiratoire surprend par son amplitude : 1 à 2 Hz crête à crête. Elle ne semble pas due à un mouvement direct de la tête lié à la respiration, car la tête du volontaire était bien maintenue, mais plutôt au mouvement de l'interface air/liquide que constitue le diaphragme. Le mouvement physiologique de cette interface présentant une forte transition de susceptibilité magnétique est suffisant pour modifier de façon non négligeable le champ B_0 à hauteur de la tête. Cet effet "à distance" de la respiration sur la fréquence de l'eau dans la tête n'a encore jamais été rapporté, mais on peut s'attendre à ce que son amplitude augmente avec l'intensité du champ magnétique B_0 . Déjà gênant à 3 T, cet effet pourrait devenir problématique sur les nouveaux aimants corps entier à 7 ou 8 T. De la même façon, nous avons remarqué que le déplacement des bras du sujet d'une position croisée à une position allongés le long du corps entraîne un décalage de fréquence de 10 Hz.

Il serait envisageable de minimiser ces oscillations de la fréquence dues à la respiration en ajustant le courant dans la bobine Z^0 de manière prospective. La fréquence du signal de l'eau pourrait en effet être prédite soit à partir d'une mesure directe du cycle respiratoire par un dispositif mécanique, soit en utilisant la mesure de la fréquence du signal RMN durant les cycles précédents. Dans cette première étude, le but n'était pas de supprimer l'oscillation à court terme de la fréquence, mais simplement de corriger la dérive de fréquence à long terme de l'aimant en évitant que la correction n'amplifie les oscillations à court terme. Pour la largeur de raie couramment obtenue à 3 T *in vivo* avec FASTMAP, soit 6-7 Hz sur un voxel de 15 ml, une telle amplification des oscillations peut affecter sérieusement la qualité des spectres obtenus. C'est pourquoi la propagation des oscillations sur la correction de fréquence a été analysée en détail. Les paramètres choisis pour la correction de fréquence *in vivo* ($N=6$, $TR=2$ s) entraînent une augmentation faible des oscillations à court terme tout en gardant une fenêtre de moyennage (12 s) relativement courte.

L'avantage le plus évident de la correction de la dérive de fréquence pour la spectroscopie du cerveau *in vivo* est une amélioration de la largeur de raie. A cause des résonances très fines obtenues, même sur de gros voxels, en ajustant les corrections non

linéaires par des méthodes analytiques comme FASTMAP, il suffit d'une dérive de fréquence de quelques Hertz pendant l'acquisition d'un spectre pour affecter la largeur de raie. Toutefois, cet effet ne devient significatif que pour une dérive cumulée approchant la largeur de raie de la résonance considérée. La Figure 11 montre en effet qu'une résonance lorentzienne de 6 Hz de largeur de raie est élargie de seulement 0,6 Hz lorsque la dérive cumulée vaut 3 Hz, mais déjà de 2,5 Hz lorsque la dérive atteint 6 Hz. De telles dérives sont inhabituelles à l'échelle de temps (quelques minutes) de l'acquisition d'un spectre proton simple, sauf si l'aimant présente un défaut affectant sa stabilité.

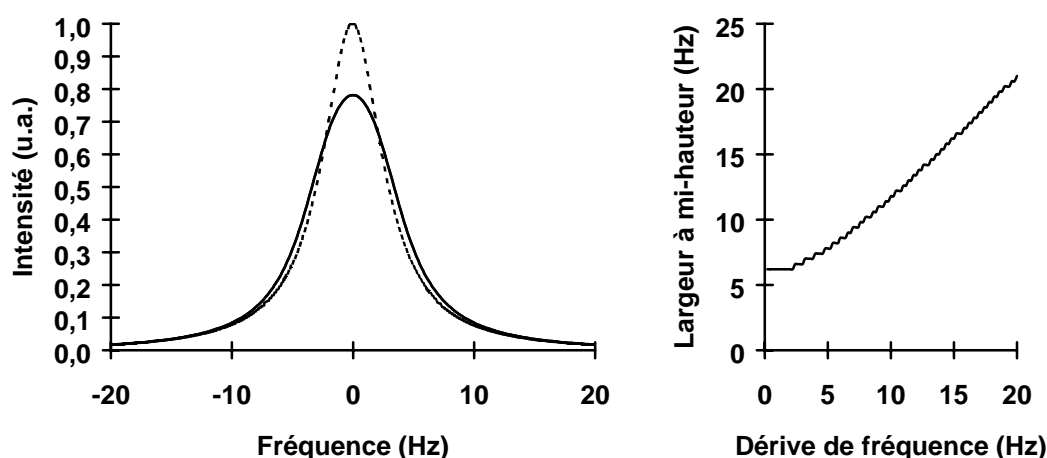


Figure 11. Simulation de l'effet d'une dérive de fréquence pendant l'accumulation d'un spectre sur la largeur de raie. Un total de 100 raies lorentziennes (largeur à mi-hauteur 6 Hz) réparties uniformément sur la gamme de fréquence correspondant à la dérive ont été additionnées. (a) raie résultante avec une dérive totale de 6 Hz (en trait plein) comparée à la raie sans dérive de fréquence (trait pointillé). La largeur de raie passe de 6 Hz à 8,5 Hz. (b) Largeur à mi-hauteur de la raie résultante en fonction de la dérive de fréquence totale pendant l'accumulation du spectre. L'élargissement est négligeable pour les dérives inférieures à la moitié de la largeur de raie.

En dehors de ces cas défavorables, l'intérêt de la correction en temps réel de la fréquence est évident dans le cas d'acquisitions longues (plusieurs dizaines de minutes) comme pour l'imagerie de déplacement chimique ou la spectroscopie 2D. Pendant une acquisition de 30 minutes, même une dérive faible de 0,1 ppm par heure conduit à une dérive de fréquence cumulée approchant la largeur de raie des métabolites. Pour de telles acquisitions, une méthode simple consiste à corriger la variation de fréquence a posteriori en appliquant un décalage de fréquence à chaque spectre individuel. Le décalage de fréquence appliqué peut être estimé en supposant une dérive linéaire de la fréquence de l'aimant. Cependant, cette méthode ne permet pas de corriger les effets délétères d'une dérive de fréquence sur l'efficacité des impulsions très sélectives en fréquence utilisées pour la suppression d'eau et l'édition

spectrale. De plus, les dérives de fréquence non linéaires ne peuvent pas être corrigées par cette approche.

La correction de fréquence améliore également de façon significative les spectres obtenus par différence, que ce soit pour les méthodes de localisation par soustraction (par exemple ISIS) ou pour l'édition spectrale d'une résonance particulière par différence (par exemple l'édition du GABA). La Figure 12 montre qu'une dérive de fréquence de seulement 0,1 Hz sur une résonance de 6 Hz de largeur de raie entraîne un résiduel de soustraction dispersif de 4% crête-crête. Un tel résiduel est par exemple inacceptable pour l'édition du GABA où l'on cherche à éliminer, par différence entre deux spectres, la résonance de la créatine avec une efficacité supérieure à 99% (voir Chapitre I.3.). Même si l'acquisition des spectres est entrelacée, en présence d'une forte dérive de 2 Hz par minute et avec un temps de répétition de 3 s, la dérive de fréquence atteint 0,1 Hz entre deux répétitions. Si une localisation ISIS en trois dimensions est réalisée sur chaque spectre avant soustraction, l'intervalle de temps entre les deux spectres est de l'ordre de 20 à 30 secondes. A cette échelle de temps, la dérive normale d'un aimant est également de l'ordre de 0,1 Hz. Même si un tel décalage de fréquence peut être corrigé en post-traitement, à condition que les spectres individuels soient stockés séparément, il semble plus efficace de traiter ce phénomène systématique en temps réel.

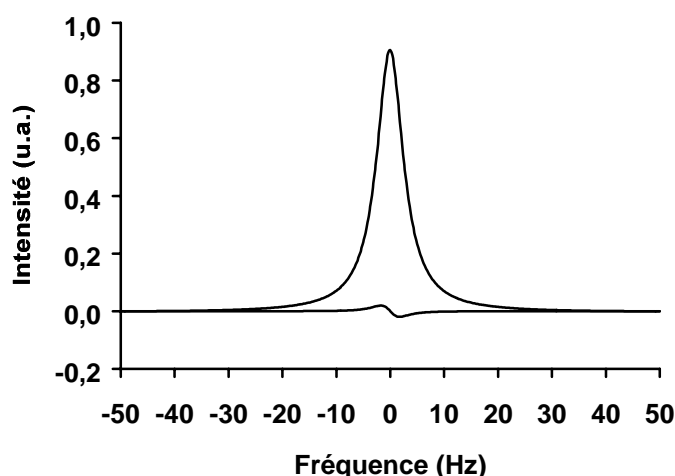


Figure 12. Artefact de soustraction entre deux raies lorentziennes identiques, de largeur à mi-hauteur égale à 6 Hz, et décalées en fréquence de 0,1 Hz. L'intensité crête à crête du résiduel dispersif atteint 4% de l'intensité de la raie avant soustraction.

I.1.5. Conclusion

Le concept de traitement en temps réel d'un signal RMN de référence pour corriger de manière prospective une source d'artefacts a déjà été appliqué en imagerie RMN en utilisant des écho-navigateurs, en particulier pour réduire les artefact de mouvement dans l'imagerie thoracique ou l'imagerie fonctionnelle du cerveau. Ainsi, la mesure de la différence de fréquence directement dans le domaine temporel a été utilisée récemment pour mesurer la position du diaphragme afin d'améliorer l'imagerie RMN abdominale et thoracique [Fool-1999]. En spectroscopie, deux équipes ont montré que la qualité des spectres obtenus dans le foie et le cerveau peut être grandement améliorée par navigation rétrospective [Tyszka-1998] ou par synchronisation a posteriori sur le cycle cardiaque [Felblinger-1998], des techniques de post-traitement qui utilisent de manière quasiment optimale le temps d'acquisition et n'introduisent pas le problème de variabilité de TR rencontré avec les méthodes classiques de synchronisation sur le cycle cardiaque ou respiratoire. La présente étude avait pour but de corriger en temps réel la dérive à long terme de l'aimant, mais elle démontre également la possibilité de réaliser un traitement en temps réel sur le spectromètre pour corriger de nombreuses sources d'artefacts affectant la qualité des spectres RMN *in vivo*.

I.2. Détection séparée en proton du [4-¹³C]glutamate et du [3-¹³C]glutamate : POCE semisélectif

I.2.1. Introduction : spectroscopie ¹³C et métabolisme du glucose

La spectroscopie RMN du carbone 13 (¹³C) est un outil unique pour mesurer *in vivo* les flux métaboliques. L'approche consiste à mesurer l'incorporation du ¹³C, isotope non radioactif du carbone détectable par RMN, dans les molécules endogènes après administration d'un précurseur marqué au ¹³C. Le précurseur marqué est chimiquement équivalent au précurseur non marqué contenant l'isotope ¹²C et est métabolisé de la même façon. La spectroscopie RMN permet de détecter spécifiquement la fraction marquée d'un métabolite à condition que sa concentration soit suffisamment élevée pour donner un signal détectable. A cause de la faible abondance naturelle du ¹³C (1,1%), la contribution du ¹³C endogène au signal mesuré devient négligeable lorsque l'enrichissement en ¹³C du métabolite détecté est suffisamment élevé.

Cette méthode a été notamment utilisée pour étudier le métabolisme oxydatif du glucose pendant une perfusion de glucose enrichi en ¹³C. Le glucose est dégradé par la glycolyse puis incorporé au cycle de Krebs. A partir de glucose marqué au ¹³C sur le carbone 1, l'analyse des réactions biochimiques mises en jeu montre que le carbone 4 du glutamate est marqué au premier tour du cycle de Krebs et que les carbones 2 et 3 sont marqués au deuxième tour. Le glutamate ne fait pas directement partie du cycle de Krebs, mais il est marqué par la réaction d'échange entre l' α -cétoglutarate et le glutamate (Figure 13).

Contrairement à tous les métabolites intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs, le glutamate est très concentré dans le cerveau des mammifères (environ 10mM) et la spectroscopie RMN peut mesurer le marquage progressif en ¹³C des carbones C3 et C4 du glutamate au cours du temps pendant une perfusion de glucose marqué au ¹³C. Les cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 obtenues expérimentalement, associées à une modélisation des réactions chimiques impliquées dans le métabolisme oxydatif, permettent de

calculer la vitesse du cycle de Krebs V_{tca} [Mason-1992b] [Mason-1995]. La question de la modélisation sera examinée en détail au chapitre II.3.

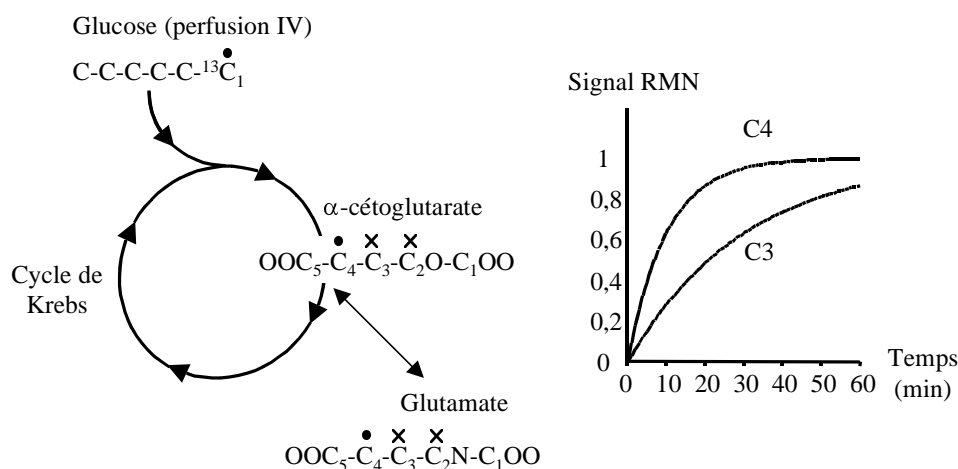


Figure 13. Marquage en ^{13}C du glutamate à partir de glucose marqué sur le carbone 1. Le glutamate est en échange avec le cycle de Krebs au niveau de l' α -cétoglutarate. Le carbone 4 du glutamate est marqué au premier tour du cycle de Krebs (\bullet) et les carbones 2 et 3 sont marqués au deuxième tour (\times).

Les techniques de détection des métabolites marqués au ^{13}C se répartissent en deux catégories : les techniques de détection ^{13}C directe et les techniques de détection indirecte des protons liés au ^{13}C . Le choix entre ces deux catégories résulte d'un compromis entre la sensibilité et l'information spectrale obtenue. La détection directe en ^{13}C offre une grande richesse d'information spectrale grâce à sa gamme de déplacements chimiques très étendue, autorisant la détection simultanée de nombreux métabolites. Elle souffre en revanche d'une mauvaise sensibilité à cause du faible rapport gyromagnétique du carbone 13. Certaines techniques (découplage proton, NOE, transfert de polarisation) améliorent la sensibilité de manière significative, mais les spectres ^{13}C restent acquis sur de gros volumes et/ou pendant des temps relativement longs pour compenser le faible rapport signal-sur-bruit. Pour cette raison, les techniques de détection indirecte constituent le meilleur choix pour mesurer des cinétiques de marquage dans de petites régions fonctionnellement spécialisées du cerveau ou dans des structures profondes (tel le striatum) avec une bonne résolution temporelle.

Si la détection indirecte des protons liés au ^{13}C améliore considérablement la sensibilité par rapport à la détection directe, ce gain est obtenu au détriment de la résolution spectrale. Le spectre proton se caractérise en effet par une faible gamme de déplacements chimiques et le recouvrement de nombreuses résonances. A très haut champ (9,4 T), il reste possible de

mesurer le marquage de nombreux métabolites (glutamate, glutamine, GABA, aspartate, lactate) [Pfeuffer-1999a]. En revanche, à champ plus faible, les résonances C3 et C4 du glutamate à 2,09 ppm et 2,33 ppm et de la glutamine à 2,14 et 2,44 ppm se superposent (Figure 14) et l'information obtenue se limite au glutamate C4 et au glutamate C3, en négligeant la contribution de la glutamine deux à trois fois moins concentrée et qui se marque plus lentement [Mason-1992b] [Hyder-1997].

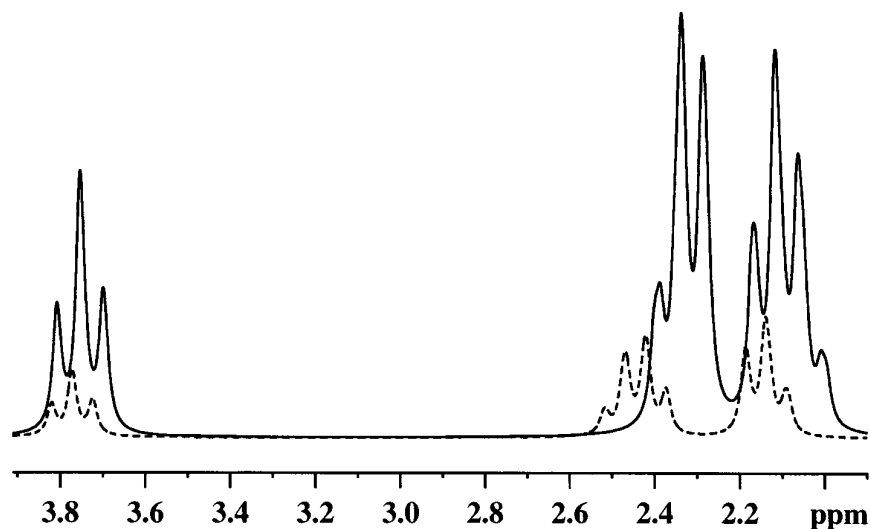


Figure 14. Simulation avec le logiciel Bruker NMRSIM[®] du spectre du glutamate et de la glutamine à 3 T. Le glutamate ($\text{OOC-C}_{(4)}\text{H}_2\text{-C}_{(3)}\text{H}_2\text{-C}_{(2)}\text{H-NH}_2\text{-COO}^-$) possède trois groupements $\text{C}_{(2)}\text{H}$, $\text{C}_{(3)}\text{H}_2$ et $\text{C}_{(4)}\text{H}_2$ dont les protons résonnent respectivement à 3,76 ppm, 2,09 ppm et 2,33 ppm (spectre en trait plein). Le spectre de la glutamine ($\text{OC-NH}_2\text{-C}_{(4)}\text{H}_2\text{-C}_{(3)}\text{H}_2\text{-C}_{(2)}\text{H-NH}_2\text{-COO}^-$) est très similaire (trait discontinu) : les groupements $\text{C}_{(2)}\text{H}$, $\text{C}_{(3)}\text{H}_2$ et $\text{C}_{(4)}\text{H}_2$ résonnent respectivement à 3,77 ppm, 2,14 ppm et 2,44 ppm. La glutamine est deux à trois fois moins concentrée que le glutamate dans le cerveau. Pour cette simulation, la concentration de glutamine choisie est quatre fois inférieure à celle du glutamate.

En dessous de 3 T, la mesure séparée du glutamate C4 et du glutamate C3 *in vivo* devient elle-même difficile à cause de la moins bonne résolution spectrale (Figure 15). Dans ce cas, il est cependant possible en première approximation de mesurer uniquement la cinétique de marquage du glutamate C4 en négligeant la contamination par le glutamate C3 qui se marque plus lentement (au deuxième tour du cycle de Krebs).

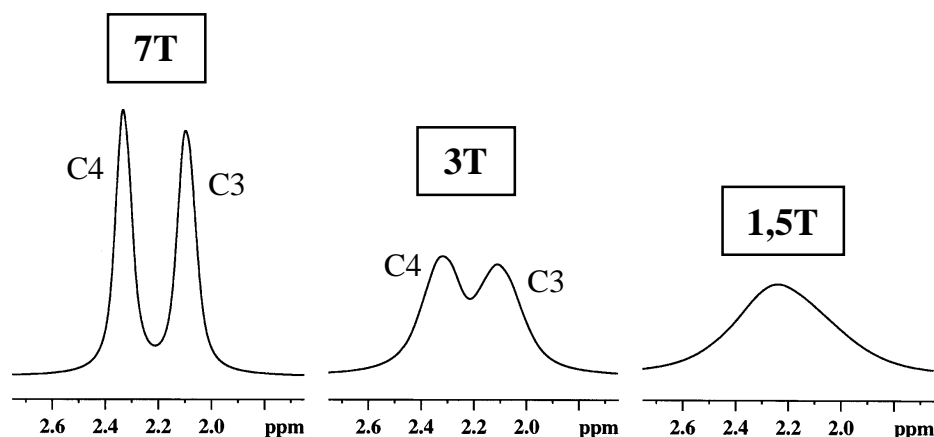


Figure 15. Simulation avec le logiciel Bruker NMRSIM[®] du spectre du glutamate à différents champs avec une largeur de raie comparable à celle obtenue *in vivo* (15 Hz). La détection séparée des résonances C3 et C4 du glutamate, possible à très haut champ, devient difficile aux champs intermédiaires (1,5T-4 T) utilisés *in vivo* chez l'homme.

La perte d'information due à la mauvaise résolution spectrale limite bien sûr l'information sur les flux métaboliques qui peut être obtenue par la modélisation des cinétiques de marquage. Par exemple, la connaissance des cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 à partir du glucose marqué, ainsi que de l'enrichissement en ¹³C du glucose plasmatique, permet de calculer à la fois la vitesse du cycle de Krebs (notée V_{tca} pour TriCarboxylic Acid cycle) et la vitesse d'échange entre l' α -cétoglutarate et le glutamate (notée V_x) [Mason-1992b]. En revanche, lorsque la cinétique de marquage du glutamate C3 ne peut pas être mesurée, V_{tca} peut toujours être calculée, mais à condition de faire une hypothèse sur les valeurs relatives de V_{tca} et de V_x [Mason-1999]. Dans la première étude menée chez le rat à 8,4 T (champ auquel les résonances des protons liés au C3 et C4 du glutamate sont résolues) et la première étude par détection ¹³C directe chez l'homme, Mason *et al.* montrent que $V_x \gg V_{\text{tca}}$ [Mason-1992b; Mason-1995]. Cette observation a été reprise comme hypothèse dans plusieurs études à résolution spectrale plus faible [Hyder-1996] [Hyder-1997] [Hyder-1999] [Mason-1999]. Il semble néanmoins que cette hypothèse ne soit pas toujours vérifiée (voir Chapitre II.3.) et la connaissance de la cinétique de marquage du glutamate C3 permet de s'affranchir de cette incertitude. Par ailleurs, on peut remarquer que le retard de la cinétique de marquage du glutamate C3 par rapport à la cinétique de marquage du glutamate C4 permet de calculer directement V_{tca} sans connaître l'enrichissement du glucose plasmatique et sans faire d'hypothèse sur V_x . La mesure de la cinétique de marquage du glutamate C3 en plus de celle

du glutamate C4 peut alors permettre d'éviter les prélèvements sanguins réguliers pour déterminer l'enrichissement du glucose plasmatique, et donc de diminuer le caractère invasif de la technique, en particulier chez l'homme. Le seul inconvénient est que la valeur de V_x ne peut plus être déterminée.

Dans ce contexte, le but de ce chapitre est de présenter une nouvelle technique de détection indirecte, appelée SPOCE (Semiselective POCE) conçue pour mesurer *séparément* et *simultanément* les cinétiques de marquage du glutamate C4 et C3, même quand ces signaux ne sont pas résolus. Après une revue des techniques de détection ^{13}C directes et des techniques de détection indirectes des protons liés au ^{13}C , la nouvelle séquence SPOCE est analysée en détail. Des résultats *in vitro* et *in vivo* démontrent l'efficacité de la technique à 3 T. Une application de la technique SPOCE à un modèle rat de la maladie de Huntington est présentée au chapitre II.3.

I.2.2. Détection des métabolites marqués au ^{13}C dans le cerveau par spectroscopie RMN : revue des techniques existantes

I.2.2.1. Détection à la fréquence du ^{13}C

Séquence impulsion-acquisition

Il est possible d'obtenir des spectres ^{13}C du cerveau avec une simple séquence impulsion-acquisition [Behar-1986; Beckmann-1991]. Le spectre est alors dominé par le signal des acides gras en abondance naturelle provenant de la graisse sous-cutanée, principalement autour de 30 ppm. Cette contamination lipidique ne pose pas de problème pour la détection du glucose C1 vers 95 ppm [Mason-1992a]. En revanche, elle empêche la détection directe du glutamate et de la glutamine C3 et C4. Dans des études cinétiques pendant perfusion d'un précurseur marqué au ^{13}C , les lipides peuvent être éliminés par soustraction de chaque spectre avec un spectre de ligne de base acquis avant perfusion. De cette manière, les cinétiques de marquage du glutamate et de la glutamine C3 et C4, dont les résonances ^{13}C se situent autour de 30 ppm, ont été obtenues avec la séquence impulsion-acquisition malgré la contamination par les lipides dans la même région du spectre [Sibson-1997] [Sibson-1998a].

Découplage proton et effet Overhauser nucléaire

Le principal inconvénient de la spectroscopie ^{13}C directe est sa faible sensibilité. La combinaison du découplage proton et de l'effet Overhauser nucléaire permet d'améliorer notablement cette sensibilité, ce qui justifie leur utilisation fréquente *in vivo*.

Le découplage proton, c'est-à-dire l'irradiation continue des résonances des protons liés au carbone pendant l'acquisition du signal ^{13}C , constitue une première façon d'améliorer le rapport signal-sur-bruit. En effet, les carbones couplés scalairement à des protons apparaissent dans le spectre ^{13}C sous forme de multiplets sous l'effet du couplage hétéronucléaire J_{CH} . Par exemple, la résonance ^{13}C d'un groupement $^{13}\text{CH}_2$ se subdivise en un triplet, entraînant une perte de résolution spectrale et surtout de rapport signal-sur-bruit. Cette subdivision des raies sous l'effet du couplage hétéronucléaire est supprimée par le découplage proton. Il est souvent souhaitable d'irradier l'ensemble du spectre proton simultanément, et non une seule résonance proton, afin de pouvoir mesurer simultanément plusieurs métabolites découplés sur le spectre ^{13}C . Ce découplage large-bande, contrairement au découplage par onde continue, pose, en particulier chez l'homme et à haut champ, le problème de la puissance RF déposée et de l'augmentation de température dans les tissus [Bottomley-1989]. Néanmoins, il a été montré récemment que le découplage large-bande est possible chez l'homme même à 4 T en respectant les limites de puissance maximale imposées par la législation [Gruetter-1996].

L'autre moyen d'augmenter le rapport signal-sur-bruit du spectre ^{13}C est l'effet Overhauser nucléaire. Si l'on considère par exemple un proton couplé de façon dipolaire à un carbone ^{13}C à l'équilibre thermodynamique, les différences de population entre les spins $-1/2$ et $1/2$, aussi bien pour le proton que pour le carbone, sont données par la distribution de Boltzmann. L'émission continue de HF à la fréquence du proton entraîne une modification de la différence de population entre les spins $-1/2$ et $1/2$ du proton qui se répercute sur la différence de population entre les spins $-1/2$ et $1/2$ du carbone couplé à ce proton par des mécanismes de relaxation croisée. L'aimantation à l'équilibre du carbone, proportionnelle à la différence de population, se trouve ainsi modifiée. Plus précisément, l'aimantation est multipliée par un facteur:

$$\eta = 1 + \frac{1}{2} \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}}$$

où γ_H et γ_C sont les rapports gyromagnétiques du proton et du carbone. Comme $\gamma_H \approx 4\gamma_C$, l'effet nOe obtenu en irradiant de manière continue le spectre proton permet d'augmenter le signal ^{13}C d'un facteur 3 au maximum. Cette relation est vraie pour de petites molécules mobiles. L'effet Overhauser maximal n'est obtenu que si la relaxation T_1 est purement dipolaire. En pratique, *in vivo*, le signal est amélioré d'un facteur, proche de 2, variable suivant les métabolites. Ceci entraîne des difficultés de quantification des métabolites *in vivo*. L'effet Overhauser nucléaire est en effet difficile à calibrer *in vitro* à cause de la variation importante des propriétés de relaxation quand on passe de mesures *in vitro* à des expériences *in vivo*.

Localisation directe en ^{13}C

La quantification précise des métabolites exige que les signaux détectés proviennent d'une région déterminée du cerveau. Une technique de localisation est alors nécessaire. La localisation directe en ^{13}C est compliquée par l'étendue de la gamme de déplacement chimique (200 ppm) qui engendre des erreurs importantes de localisation pour des métabolites possédant des fréquences de résonance très différentes. La localisation est en effet réalisée le plus souvent grâce à des impulsions sélectives en fréquence appliquées en présence d'un gradient, et la région effectivement sélectionnée varie en fonction de la résonance d'intérêt dans le spectre. A titre d'exemple, supposons qu'une tranche de 4 cm d'épaisseur soit sélectionnée avec une impulsion de 4000 Hz de largeur spectrale, soit un gradient de sélection de 1000 Hz/cm. La différence de fréquence entre le glucose C1 β (96.6 ppm) et le glutamate C3 (27.7 ppm) est de 5000 Hz environ à 3 T. Par conséquent, les tranches de détection du glucose et du glutamate sont décalées de 5 cm, une valeur supérieure à l'épaisseur de la tranche. La localisation ISIS a cependant été utilisée en restreignant l'observation des résonances à une petite bande spectrale autour de la fréquence d'émission, par exemple la région du glucose C1 vers 95 ppm [Gruetter-1992a], du myo-inositol vers 75 ppm [Gruetter-1992b] ou du glutamate et de la glutamine C3 et C4 vers 30 ppm [Gruetter-1994].

Transfert de polarisation

Le principal avantage du transfert de polarisation *in vivo* est de pouvoir effectuer la localisation du signal en proton avant le transfert de polarisation vers le ^{13}C , réduisant ainsi considérablement les artefacts de déplacement chimique. Cependant, l'objectif initial de la technique était d'augmenter la sensibilité de la spectroscopie des noyaux peu sensibles comme le ^{13}C en transférant une partie de la sensibilité du proton vers le ^{13}C . Le gain de sensibilité

est comparable, voire supérieur, à celui apporté par l'effet nOe (qui ne peut pas être utilisé en même temps) [Bomsdorf-1991] [van den Bergh-1998]. Par conséquent, le transfert de polarisation permet d'obtenir une sensibilité équivalente au nOe tout en améliorant de façon décisive la localisation. Il s'agit donc d'une technique particulièrement prometteuse pour les études localisées quantitatives par détection ^{13}C directe.

Les séquences les plus classiques de transfert de polarisation hétéronucléaire sont INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) [Morris-1979], DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) [Doddrell-1982] et la polarisation croisée hétéronucléaire dans le référentiel tournant [Artemov-1995]. Ces séquences ne seront pas analysées en détail ici. Mentionnons simplement que la séquence INEPT présente l'inconvénient d'aboutir à des multiplets antiphase alors que la séquence DEPT donne des multiplets refocalisés. Le découplage proton dans INEPT annule le gain de sensibilité apporté par le transfert de polarisation. Il existe cependant une version refocalisée de INEPT [Borum-1980]. Une version adiabatique de INEPT refocalisée a également été développée [Merkle-1992] Par ailleurs, avec les séquences DEPT ou INEPT refocalisée, le gain de sensibilité dépend du système de spin (CH , CH_2 ou CH_3) et un compromis doit être trouvé pour détecter simultanément des systèmes de spins différents.

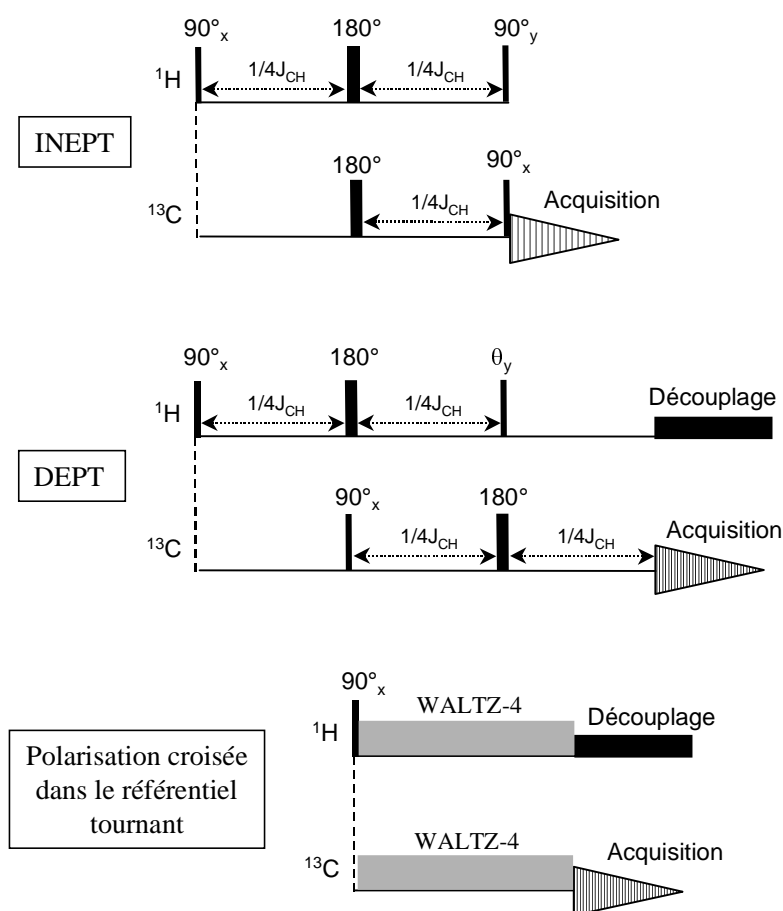


Figure 16. Techniques de détection ^{13}C par transfert de polarisation hétéronucléaire.

L'application de ces techniques *in vivo* est récente. La séquence PRECISELY [Gruetter-1996], combinaison de ISIS et de DEPT, a permis d'explorer *in vivo* dans le cerveau humain par détection ^{13}C localisée le transport du glucose [Gruetter-1998b] et le métabolisme du glutamate [Gruetter-1998a] (Figure 17). Shen *et al.* ont mesuré le marquage du glutamate et de la glutamine à partir du glucose grâce à une séquence INEPT refocalisée adiabatique [Shen-1999a]. Enfin, le métabolisme du glucose a été mesuré dans des tumeurs par polarisation croisée hétéronucléaire [Artemov-1995].

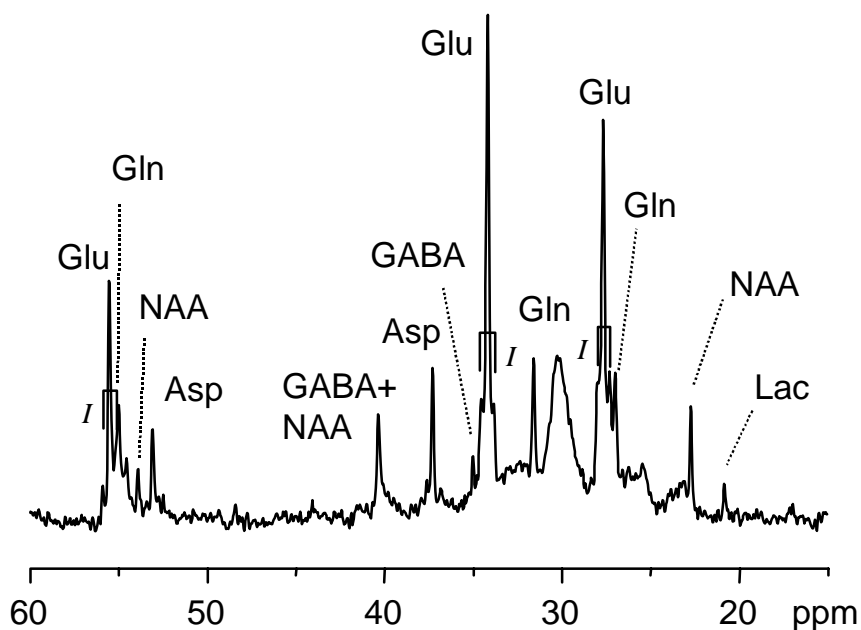


Figure 17. Spectre ^{13}C localisé représentatif obtenu à 4,1 T dans le lobe occipital d'un volontaire avec la technique PRECISELY. Le spectre représente une accumulation pendant 50 min sur un volume de 72 ml approximativement 60 minutes après le début de la perfusion de glucose. Les couplages homonucléaires ^{13}C - ^{13}C (isotopomères) sont visibles sur le glutamate. D'après [Gruetter-1998a].

I.2.2.2. Détection indirecte des protons couplés au ^{13}C

Satellites ^{13}C

La présence d'un atome de carbone 13 dans une molécule divise la résonance des protons liés à ce carbone en un doublet sous l'effet du couplage hétéronucléaire J_{CH} . Considérons par exemple une molécule simple, le formate HCOO^- . La Figure 18 montre le spectre d'un mélange de formate ^{12}C et de formate ^{13}C . Celui-ci apparaît sous la forme d'un pseudo-triplet par superposition d'un singulet correspondant au formate ^{12}C (raie-mère) et d'un doublet correspondant au formate ^{13}C (satellites). Le rapport de l'intensité des satellites sur l'intensité de la raie-mère dépend de l'enrichissement en ^{13}C du mélange défini par le rapport de la concentration de formate marqué par rapport à la concentration totale de formate. De même, pour une molécule qui possède plusieurs protons comme le glutamate, chaque résonance proton (ici chaque triplet) est divisée en deux lorsque le carbone auquel sont liés les protons est un carbone 13. La Figure 19 montre par exemple un spectre de glutamate marqué au ^{13}C sur les trois carbones C2, C3 et C4.

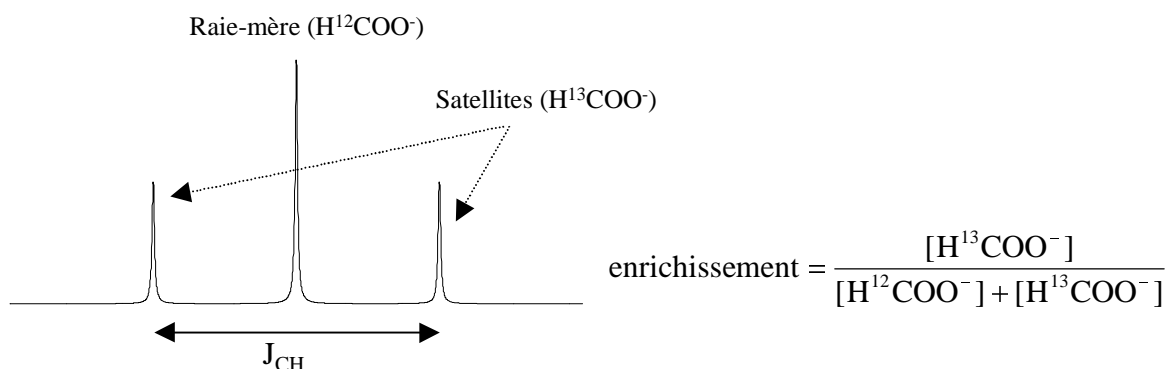


Figure 18. Représentation du spectre d'une solution de formate partiellement marqué au ^{13}C . La raie-mère centrale correspond aux protons liés au ^{12}C et les raies latérales (satellites) correspondent aux protons liés au ^{13}C . La mesure du spectre proton permet de calculer directement l'enrichissement en ^{13}C du mélange.

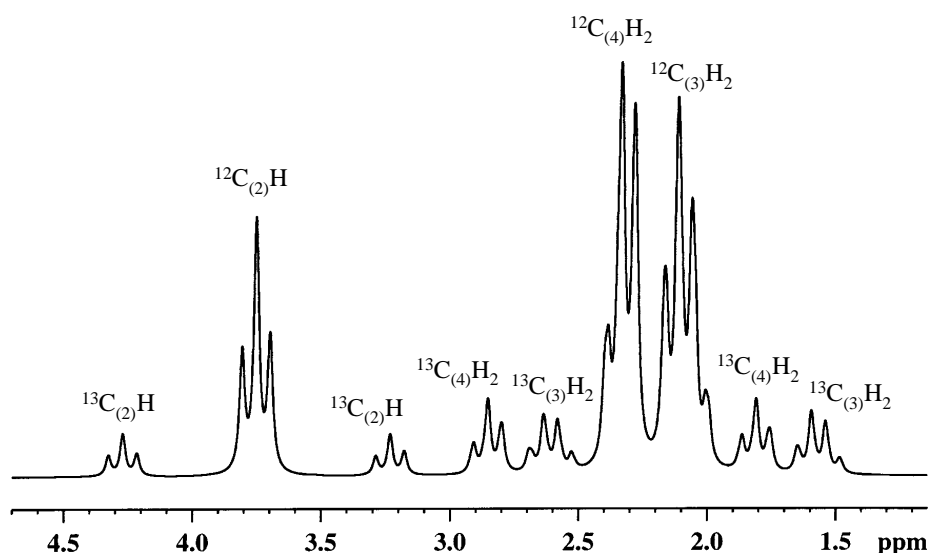


Figure 19. Simulation avec le logiciel Bruker NMRSIM[®] du spectre du glutamate marqué au ^{13}C sur les carbones 2, 3 et 4, obtenu avec une séquence impulsion-acquisition à 3 T. Pour chaque multiplet correspondant respectivement aux protons des groupements $\text{C}_{(2)}\text{H}$, $\text{C}_{(3)}\text{H}_2$ et $\text{C}_{(4)}\text{H}_2$, la fraction marquée au ^{13}C du glutamate apparaît sous la forme de satellites. La largeur de raie est de 3 Hz et l'enrichissement uniforme en ^{13}C est de 25%.

Il est donc possible sur un spectre proton de mesurer la fraction marquée au ^{13}C d'un métabolite en détectant les satellites des carbones marqués. Même si cette mesure est parfois possible directement sur un simple spectre proton, il est souvent nécessaire de simplifier le spectre par des techniques d'édition. Plusieurs techniques d'édition hétéronucléaires utilisent le couplage hétéronucléaire J_{CH} pour mesurer sélectivement le signal des proton liés à un carbone 13 en éliminant le signal des protons liés à un carbone 12. Ces techniques peuvent

être vues comme un double transfert de cohérence, du proton vers le ^{13}C , puis du ^{13}C vers le proton.

Gain de sensibilité de la détection indirecte par rapport à la détection directe

La détection indirecte des proton liés au ^{13}C augmente la sensibilité d'au moins un ordre de grandeur par rapport à la détection directe en ^{13}C . Le gain de signal en prenant en compte uniquement la sensibilité relative des noyaux protons et ^{13}C est :

$$\frac{\Psi_{\text{H}}}{\Psi_{\text{C}}} = \left[\frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}} \right]^3 \cdot \frac{1}{\eta} \cdot \frac{N_{\text{H}}}{N_{\text{C}}}$$

où γ désigne le rapport gyromagnétique, η le gain par effet nOe et N le nombre de noyaux. Pour un groupement CH_2 ($N_{\text{H}}=2$, $N_{\text{C}}=1$), le gain en signal est d'environ 43.

Cependant, le gain de sensibilité ne dépend pas seulement du signal mais également du bruit et de la largeur de raie. Le bruit provenant de l'échantillon augmente linéairement avec la fréquence, et la figure de bruit d'un préamplificateur augmente également avec la fréquence. De plus, la largeur de raie est plus élevée en proton qu'en ^{13}C . Le gain de sensibilité peut être exprimé par la formule [Novotny-1990] :

$$\frac{\Psi_{\text{H}}}{\Psi_{\text{C}}} = \left[\frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}} \right]^3 \cdot \frac{1}{\eta} \cdot \frac{N_{\text{H}}}{N_{\text{C}}} \cdot \frac{\gamma_{\text{C}}}{\gamma_{\text{H}}} \cdot \left[\frac{T_1}{\Delta\nu_{1/2}} \right]_{\text{H}}^{\frac{1}{2}} \cdot \left[\frac{\Delta\nu_{1/2}}{T_1} \right]_{\text{C}}^{\frac{1}{2}} \cdot \left[\frac{(1 - Q_1 / Q_{\text{ul}})_{\text{H}}}{(1 - Q_1 / Q_{\text{ul}})_{\text{C}}} \right]^{\frac{1}{2}} \cdot \left[\frac{(10^{F/20})_{\text{C}}}{(10^{F/20})_{\text{H}}} \right] \cdot \left[e^{-\frac{TE}{T_2}} \right]_{\text{H}}$$

où γ est le rapport gyromagnétique, N le nombre de noyaux, T_1 le temps de relaxation longitudinal, $\Delta\nu_{1/2}$ la largeur de raie, Q_1 et Q_{ul} les facteurs de qualité des antennes chargées et non chargées, F la figure de bruit du préamplificateur en dB, TE le temps d'écho en proton (la détection en ^{13}C étant faite avec une séquence impulsion-acquisition), T_2 le temps de relaxation transverse et η le gain par effet nOe. La justification de cette formule est discutée en détail dans la référence citée. Novotny *et al.* ont mesuré expérimentalement dans le cerveau de lapin un facteur 14 entre la détection directe d'éthanol marqué au ^{13}C (avec découplage et nOe) et la détection indirecte par POCE, une valeur proche du facteur 8,5 prévue par la formule dans leurs conditions expérimentales. L'écart entre les deux valeurs peut s'expliquer notamment par un effet nOe *in vivo* moins important que la valeur théorique maximale de 3.

Par ailleurs, si l'on examine les spectres obtenus récemment à 4 T chez l'homme en antenne de surface, le NAA en abondance naturelle (soit 0,11 mM de ^{13}C) est détecté par POCE dans 12 ml en 12 minutes [Chen-1998]. En comparaison, par détection directe en ^{13}C avec PRECISELY, Gruetter *et al.* détectent le NAA en abondance naturelle dans 180 ml en 72 minutes [Gruetter-1996]. Même si la comparaison de rapport signal-sur-bruit entre les deux spectres est approximative à cause de paramètres de filtrage différents, la différence de résolution spatiale et temporelle est évidente (Figure 20).

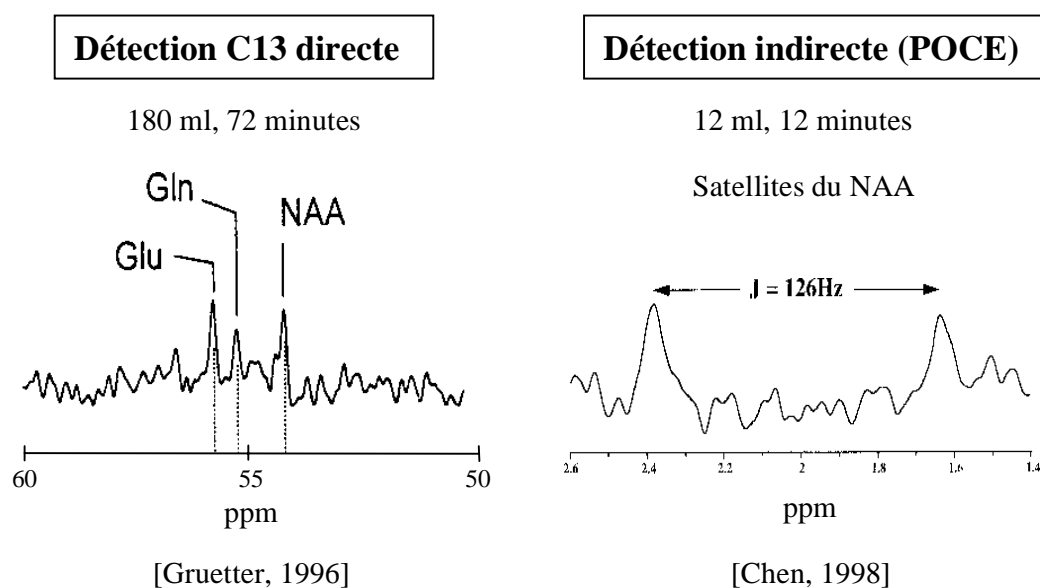


Figure 20. Comparaison de deux spectres en abondance naturelle obtenus récemment dans le lobe occipital chez l'homme à 4 T avec détection par sonde de surface. (a) Détection ^{13}C directe avec transfert de polarisation et découplage proton pendant l'acquisition. Le pic du C2 du NAA est visible à 53,9 ppm. (b) Détection indirecte des protons du NAA couplés au ^{13}C à 2,02 ppm avec la technique POCE, sans découplage ^{13}C pendant l'acquisition. Le spectre (a) représente une accumulation de 72 minutes sur un volume de 180 ml alors que le spectre (b) ne représente que 12 minutes d'accumulation sur un volume de 12 ml.

Méthodes d'édition des satellites par différence

Une première famille de séquences permettent de détecter sélectivement les protons couplés au ^{13}C par différence entre deux spectres. Dans ces méthodes d'édition, une impulsion ^{13}C est appliquée une acquisition sur deux pour inverser sélectivement les satellites. Par soustraction, les raies ^{12}C disparaissent et seules restent les raies ^{13}C . La plus utilisée de ces techniques est la méthode POCE (Proton-Observed Carbon-Edited) [Rothman-1985] dans laquelle l'impulsion d'inversion ^{13}C est placée dans un écho de spin. La séquence POCE est décrite en détail au chapitre suivant (Chapitre I.2.2.3.).

Suivant le même principe que POCE, l'impulsion d'inversion ^{13}C a été combinée avec une séquence J-refocalisée par transfert de cohérence [Pan-1997; Mason-1999], avec une séquence PRESS [Chen-1998] et avec une séquence STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode) [Pfeuffer-1999a]. Dans cette dernière séquence, le temps T_M , durant lequel l'aimantation est longitudinale et ne subit pas la J-modulation, est utilisé pour appliquer une impulsion d'inversion adiabatique large bande qui inverse efficacement tout le spectre proton, permettant ainsi de détecter l'ensemble des satellites ^{13}C simultanément même à 9,4 T.

Enfin, en combinant la technique POCE avec l'imagerie spectroscopique écho-planar, la méthode ICED-PEPSI (*In vivo* Carbon-Edited Detection with Proton Echo-Planar Spectroscopic Imaging) a permis de mesurer chez le rat à 7T les cinétiques de marquage dans tout le cerveau simultanément avec une résolution spatiale de 8 μl et une résolution temporelle de 11 minutes [Hyder-1999]. Cependant, dans cette étude, l'homogénéité du champ B_0 n'était pas suffisante pour détecter séparément les satellites C3 et C4 du glutamate.

Méthodes de spectroscopie 2D

La spectroscopie 2D hétéronucléaire permet également de détecter les métabolites marqués au ^{13}C . Les protons couplés au ^{13}C apparaissent sous la forme de pics de corrélation sur les spectres 2D. Sur ces spectres, la première dimension correspond à la fréquence ^{13}C (encodage de phase par incrément de t_1) et la deuxième dimension correspond à la fréquence proton (encodage de fréquence t_2 pendant l'acquisition). Les deux méthodes les plus classiques sont les séquences HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) [van Zijl-1993] et HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) décrites sur la Figure 21. Dans ces deux séquences, la sélection des cohérences désirées peut se faire soit par cyclage de phase, soit par des gradients [Ruiz-Cabello-1992]. Une version 1D de ge-HMQC (gradient-enhanced HMQC) a été utilisée pour mesurer les protons couplés au ^{13}C en une seule acquisition sur le cerveau de rat [Inubushi-1993]. La séquence HSQC est une combinaison d'une séquence INEPT et d'une séquence INEPT inversée pour revenir en détection proton. Elle a permis récemment d'obtenir des spectres 2D avec la sensibilité du proton et la résolution spectrale du ^{13}C chez le macaque [Watanabe-2000a] et chez l'homme [Watanabe-2000b].

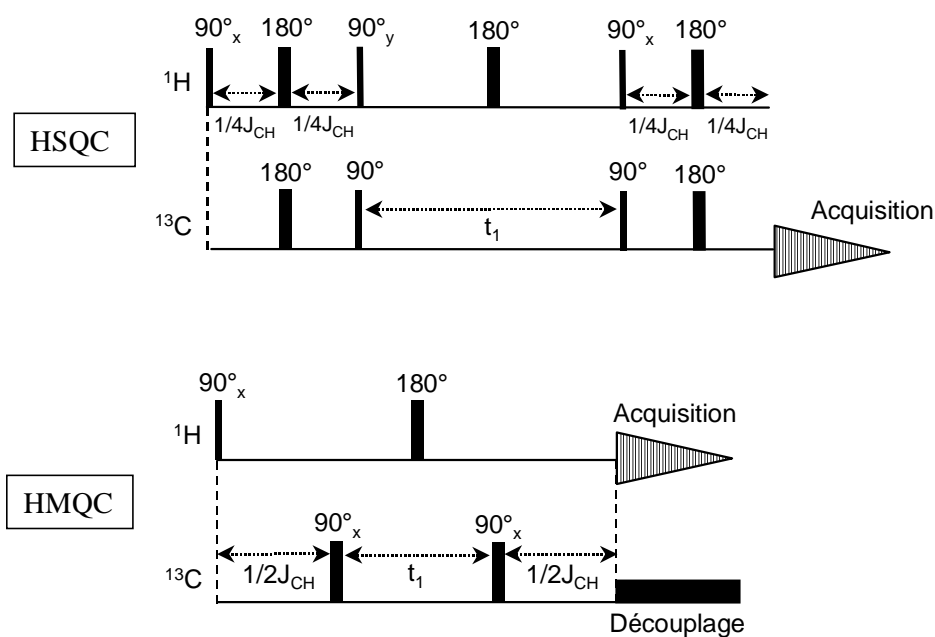


Figure 21. Séquences de spectroscopie 2D hétéronucléaires HSQC et HMQC.

I.2.2.3. La méthode Proton-Observed Carbon-Edited (POCE)

La technique POCE a été décrite initialement par Rothman et coll. [Rothman-1985]. Elle a permis d'obtenir les premières cinétiques de marquage, détectées en proton, du glutamate C4 et C3 chez le rat à 8,4T [Fitzpatrick-1990] et du glutamate C4 chez l'homme à 2.1T [Rothman-1992] à partir de glucose marqué. Elle reste la technique la plus largement employée pour mesurer les cinétiques de marquage isotopique par RMN *in vivo*.

Principe

La séquence est composée d'un simple écho de spin sur le canal proton et d'une impulsion d'inversion appliquée une fois sur deux à la fréquence du ^{13}C . L'impulsion ^{13}C est appliquée un temps $\tau_3 = 1/(2J_{\text{CH}})$ avant le début de l'acquisition, où J_{CH} est la constante de couplage hétéronucléaire proton-carbone. La valeur de J_{CH} est en général comprise entre 100 et 200 Hz suivant les molécules, ce qui donne une valeur de τ_3 comprise entre 2,5 et 5 ms.

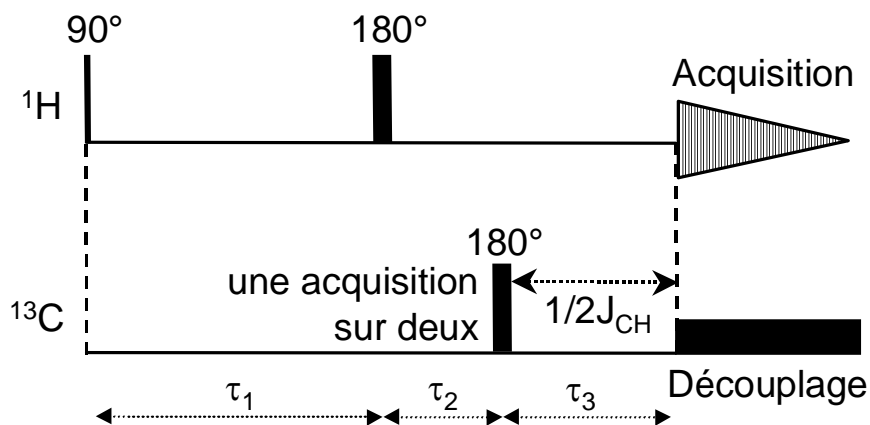


Figure 22. Schéma de la séquence Proton-Observed Carbon-Edited (POCE). Sur le canal proton, la séquence est composée d'un simple écho de spin. Sur le canal ^{13}C , une impulsion d'inversion est émise une acquisition sur deux à un temps $1/2J_{\text{CH}}$ avant le début de l'acquisition, et une impulsion de découplage est éventuellement appliquée pendant l'acquisition.

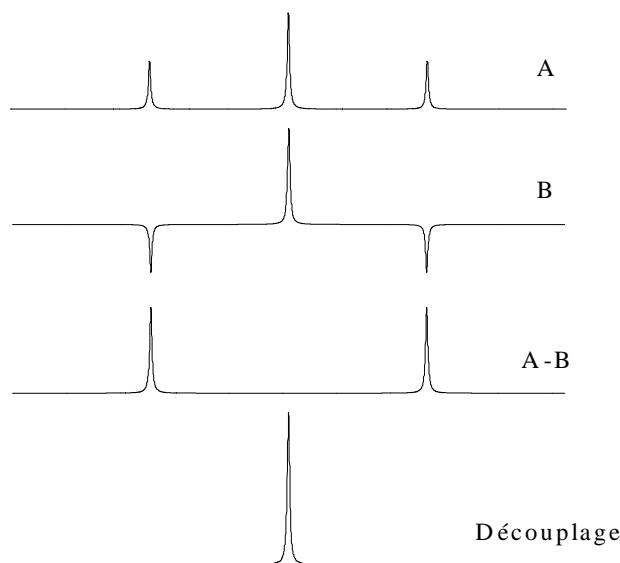


Figure 23. Représentation de l'effet de la séquence POCE sur les protons couplés au ^{13}C . Dans la séquence A, sans impulsion d'inversion ^{13}C , les satellites sont détectés en phase avec la raie-mère. Lorsque l'impulsion ^{13}C est appliquée (séquence B), les satellites sont inversés par rapport à la raie-mère. La différence A-B élimine la raie-mère et ne conserve que les protons couplés au ^{13}C . Le découplage supprime les effets du couplage J pendant l'acquisition et permet de gagner un facteur deux en rapport signal-sur-bruit.

Comme le montre le calcul effectué plus loin, l'impulsion d'inversion ^{13}C appliquée une fois sur deux a pour effet d'inverser les satellites par rapport à la raie-mère (Figure 23). La soustraction d'un spectre sans inversion des satellites et d'un spectre avec inversion des satellites supprime la raie-mère et ne conserve que les satellites. La séquence POCE supprime

donc les protons liés au ^{12}C pour ne détecter que les protons liés au ^{13}C . Par ailleurs, le découplage ^{13}C (c'est-à-dire l'irradiation continue à la fréquence du ^{13}C pendant l'acquisition du signal proton) permet de supprimer l'effet du couplage J_{CH} pendant l'acquisition. Le doublet édité correspondant aux satellites dégénère en un singulet, ce qui améliore le rapport signal-sur-bruit d'un facteur deux.

Analyse de la séquence POCE avec le formalisme des opérateurs-produits

Le formalisme des opérateurs-produits [Sørensen-1983; Howarth-1986] permet de calculer de manière rigoureuse le comportement quantique d'un système de spins couplés sous l'effet d'une séquence RMN. Dans le calcul qui suit, les effets de déplacement chimique seront ignorés car ils sont refocalisés par l'écho de spin. De plus, la phase de toutes les impulsions radiofréquence sera supposée égale à x . L'effet de la séquence POCE sera examiné successivement sur un proton non couplé à un carbone 13 et sur un proton couplé, avec et sans application de l'impulsion d'inversion ^{13}C . Le spin I représente le proton et le spin S le carbone.

Premier cas : effet de la séquence POCE sur un proton non couplé à un carbone 13

L'aimantation évolue sous le seul effet des impulsions radiofréquence :

$$I_z \xrightarrow{90_x^\circ} -I_y \xrightarrow{\tau_1} -I_y \xrightarrow{180_x^\circ} I_y \xrightarrow{\tau_2 + \tau_3} I_y$$

Deuxième cas : effet de la séquence POCE sur un proton couplé à un carbone 13 lorsque l'impulsion d'inversion ^{13}C n'est pas appliquée

L'impulsion d'excitation bascule l'aimantation I_z dans le plan transversal :

$$\sigma(0)^+ = -I_y$$

L'aimantation évolue pendant τ_1 sous l'effet du couplage J :

$$\sigma(\tau_1)^- = -I_y \cos(\pi J \tau_1) + 2I_x S_z \sin(\pi J \tau_1)$$

L'impulsion 180° sur x inverse I_y :

$$\sigma(\tau_1)^+ = I_y \cos(\pi J \tau_1) + 2I_x S_z \sin(\pi J \tau_1)$$

L'aimantation évolue alors pendant le délai τ_2 :

$$\begin{aligned} \sigma(\tau_1 + \tau_2) &= \cos(\pi J \tau_1) \cdot [I_y \cos(\pi J \tau_2) - 2I_x S_z \sin(\pi J \tau_2)] \\ &\quad + \sin(\pi J \tau_1) \cdot [2I_x S_z \cos(\pi J \tau_2) + I_y \sin(\pi J \tau_2)] \\ &= I_y \cdot [\cos(\pi J \tau_1) \cos(\pi J \tau_2) + \sin(\pi J \tau_1) \sin(\pi J \tau_2)] \\ &\quad - 2I_x S_z \cdot [\cos(\pi J \tau_1) \sin(\pi J \tau_2) - \sin(\pi J \tau_1) \cos(\pi J \tau_2)] \\ &= I_y \cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) + 2I_x S_z \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \end{aligned}$$

L'aimantation évolue de la même façon pendant le délai τ_3 :

$$\sigma(\tau_1 + \tau_2 + \tau_3) = I_y \cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2 - \tau_3)) + 2I_x S_z \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2 - \tau_3))$$

Comme $\tau_1 = \tau_2 + \tau_3$ à cause de la symétrie de l'écho de spin, on obtient :

$$\sigma(\tau_1 + \tau_2 + \tau_3) = I_y$$

Par conséquent, lorsque l'impulsion d'inversion ^{13}C n'est pas appliquée, les protons couplés à un carbone 13 sont détectés avec la même phase que les protons non couplés. Autrement dit, les satellites sont en phase avec la raie-mère.

Troisième cas : effet de la séquence POCE sur un proton couplé à un carbone 13 lorsque l'impulsion d'inversion ^{13}C est appliquée

Jusqu'à l'impulsion d'inversion ^{13}C , l'aimantation évolue comme précédemment :

$$\sigma(\tau_1 + \tau_2)^- = I_y \cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) + 2I_x S_z \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2))$$

L'impulsion d'inversion ^{13}C change le signe de S_z :

$$\sigma(\tau_1 + \tau_2)^+ = I_y \cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) - 2I_x S_z \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2))$$

Puis l'aimantation évolue pendant le délai τ_3 :

$$\begin{aligned}
\sigma(\tau_1 + \tau_2 + \tau_3) &= \cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \cdot [I_y \cos(\pi J \tau_3) - 2I_x S_z \sin(\pi J \tau_3)] \\
&\quad - \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \cdot [2I_x S_z \cos(\pi J \tau_3) + I_y \sin(\pi J \tau_3)] \\
&= I_y \cdot [\cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \cos(\pi J \tau_3) - \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \sin(\pi J \tau_3)] \\
&\quad - 2I_x S_z \cdot [\cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \sin(\pi J \tau_3) + \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2)) \cos(\pi J \tau_3)] \\
&= I_y \cos(\pi J(\tau_1 - \tau_2 + \tau_3)) - 2I_x S_z \sin(\pi J(\tau_1 - \tau_2 + \tau_3))
\end{aligned}$$

En remplaçant τ_1 par $\tau_2 + \tau_3$, on obtient finalement :

$$\sigma(\tau_1 + \tau_2 + \tau_3) = I_y \cos(2\pi J \tau_3) - 2I_x S_z \sin(2\pi J \tau_3)$$

Par conséquent, lorsque l'impulsion d'inversion ^{13}C est appliquée, les satellites subissent une modulation de phase proportionnelle à τ_3 .

Dans le cas particulier où $\tau_3 = 1/2J$, on a :

$$\sigma(\tau_1 + \tau_2 + \tau_3) = -I_y$$

C'est-à-dire que les satellites sont inversés par rapport à la raie-mère.

En conclusion de ce calcul, les satellites se refocalisent en phase avec la raie-mère lorsque l'impulsion d'inversion ^{13}C n'est pas appliquée et en opposition de phase avec la raie-mère lorsqu'elle est appliquée.

Remarques :

- 1) Au lieu d'être appliquée un temps $1/2J$ avant le début de l'acquisition, l'impulsion d'inversion ^{13}C peut de manière équivalente être appliquée à un temps $1/2J$ après l'excitation.
- 2) Dans le cas particulier où le temps d'écho est égal à $1/J$, l'impulsion d'inversion ^{13}C est appliquée en même temps que l'impulsion de refocalisation proton, ce qui conduit à la séquence de la Figure 24a.

- 3) La technique POCE décrite originalement par Rothman et coll. (Figure 24b) utilisait un découplage à la place de l'impulsion d'inversion ^{13}C . Le temps d'écho de la séquence était égal à $2/J$ et le découplage était appliqué une première fois pendant toute la durée du temps d'écho et une deuxième fois pendant la seconde moitié du temps d'écho seulement. Le découplage a pour effet de supprimer la J-modulation. Lorsque le découplage est appliqué pendant la totalité du temps d'écho, les satellites sont donc en phase avec la raie-mère. En revanche, lorsque le découplage n'est pas appliqué pendant la première moitié du temps d'écho, les satellites évoluent sous l'effet de la J-modulation et sont inversés par rapport à la raie-mère au bout d'un temps $1/J$. Comme la J-modulation est supprimée par le découplage dans la deuxième moitié du temps d'écho, les satellites sont toujours inversés par rapport à la raie-mère au début de l'acquisition.

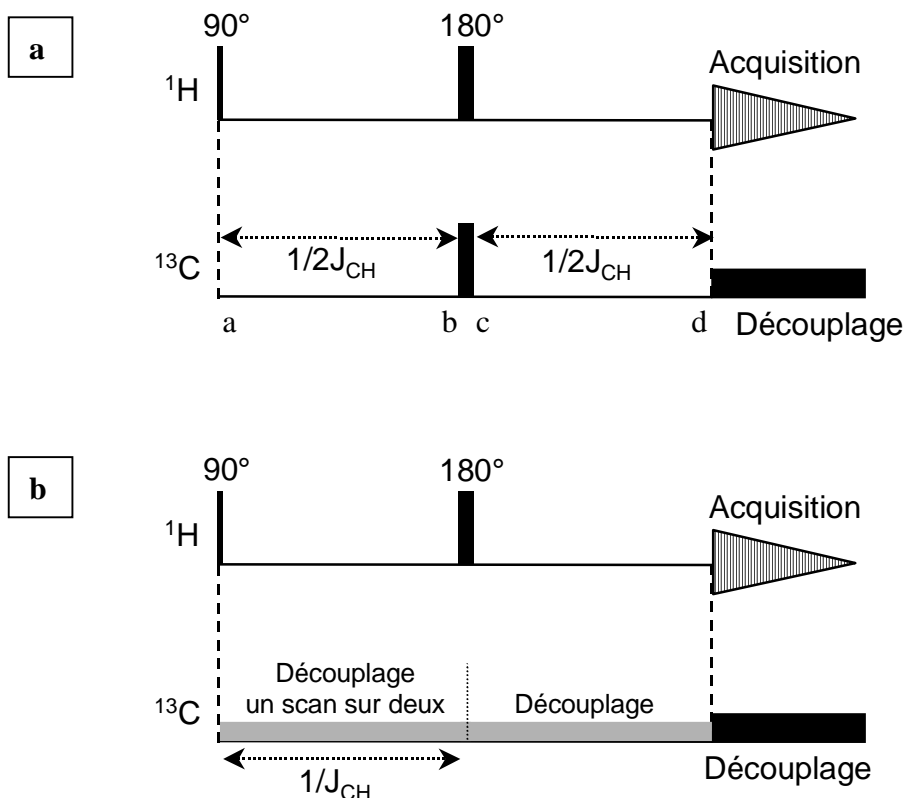


Figure 24. Variantes de la séquence POCE. (a) L'impulsion d'inversion ^{13}C peut être appliquée en même temps que l'impulsion de refocalisation proton. Dans cette version symétrique de la séquence POCE, le temps d'écho total de la séquence est fixé à $1/J_{\text{CH}}$. (b) Dans la version originale proposée par Rothman et al., l'édition est réalisée par un découplage continu à la fréquence du ^{13}C et interrompu une acquisition sur deux pendant la première moitié du temps d'écho.

Analyse vectorielle de la séquence POCE

La séquence POCE peut également être analysée en utilisant le modèle vectoriel. Cette représentation, inexacte en général pour décrire l'évolution d'un système de spins couplés, doit être utilisée avec précaution. Elle donne cependant dans certains cas une vision plus intuitive de cette évolution que les formalismes issus de la mécanique quantique, comme le formalisme des opérateurs-produits.

Considérons par exemple le cas particulier de la séquence POCE symétrique avec un temps d'écho $1/J$ (Figure 24a). On se place dans le référentiel tournant à la fréquence de la raie-mère. Dans ce référentiel, la raie-mère est à la résonance, et la fréquence des satellites est $-J/2$ et $+J/2$ Hz. Les aimantations correspondant aux raies de chacun des deux satellites et à la raie-mère sont donc représentées respectivement par un vecteur tournant à la fréquence $-J/2$, $+J/2$ et 0 Hz dans le référentiel tournant (Figure 25).

Prenons d'abord le cas où il n'y a pas d'impulsion d'inversion ^{13}C . L'impulsion $90^\circ(+x)$ bascule les trois aimantations dans le plan transverse selon $-y$. Ces aimantations évoluent alors pendant la première moitié du temps d'écho ($t=1/2J$). Durant cette période, l'aimantation de la raie-mère reste fixe et les deux aimantations des satellites accomplissent un quart de tour. Le pulse $180^\circ(+x)$ n'a pas d'effet sur les aimantations des satellites alignées selon x , mais bascule de 180° l'aimantation de la raie-mère. Pendant la deuxième partie du temps d'écho, les aimantations des satellites continuent à tourner d'un demi-tour et se refocalisent avec l'aimantation de la raie-mère selon $+y$. Le résultat est donc un spectre dont les satellites sont en phase avec la raie-mère.

Lorsque l'impulsion d'inversion ^{13}C est rajoutée, l'évolution est la même au détail près que l'impulsion ^{13}C inverse les populations de spins du carbone. Ceci a pour effet d'inverser le sens de rotation des aimantations correspondant à chaque satellite. L'aimantation qui tournait à $+J/2$ Hz avant l'impulsion d'inversion ^{13}C tourne ensuite à $-J/2$ Hz et réciproquement. Pendant la deuxième moitié du temps d'écho, les satellites se refocalisent en antiphase par rapport à la raie-mère. Le résultat est donc un spectre dont les satellites sont inversés par rapport à la raie-mère.

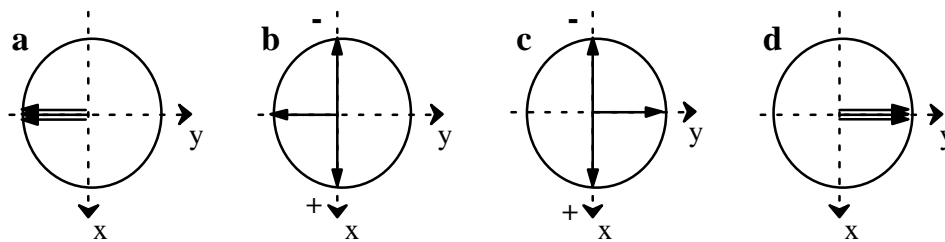
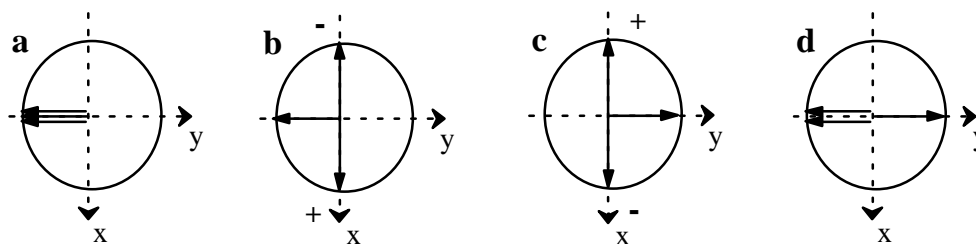
Séquence A (sans inversion C13)**Séquence B (avec inversion C13)**

Figure 25. Analyse de la séquence POCE symétrique avec le formalisme vectoriel. Les temps notés a, b, c, d sont représentés sur la Figure 24a. Les trois flèches représentent l'aimantation de la raie-mère, fixe dans le référentiel tournant, et les aimantations de chacun des deux satellites notées + et -. Dans la séquence B, l'inversion ^{13}C inverse les sens de rotation des aimantations correspondant aux satellites, qui se refocalisent en antiphase par rapport à l'aimantation de la raie-mère.

I.2.3. POCE semisélectif : théorie

La séquence SPOCE

La séquence SPOCE (Figure 26) est identique à la séquence POCE de la Figure 22, à l'exception de l'impulsion d'inversion ^{13}C qui est remplacée par deux impulsions d'angle θ_1 et θ_2 . Le délai τ qui sépare les deux impulsions ^{13}C est égal à $1/2\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$ où $\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$ est l'écart de fréquence ^{13}C entre les carbones C3 et C4 situés réciproquement à 27,7 ppm et 34,4 ppm. Cet écart de fréquence vaut $\Delta\nu_{\text{C3-C4}}=201$ Hz sur l'aimant du SHFJ à 2,94 T. Le délai entre l'impulsion d'excitation proton et la première impulsion ^{13}C est égal à $1/2J_{\text{CH}}$, ainsi que le délai entre la deuxième impulsion ^{13}C et le début de l'acquisition.

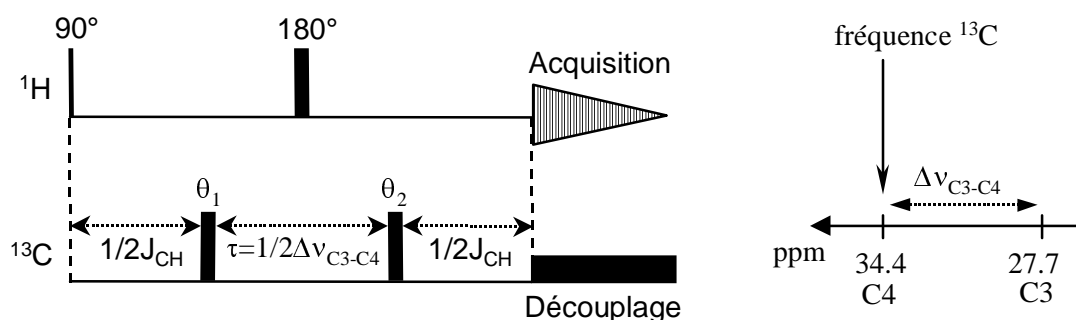


Figure 26. Schéma de la séquence Semiselective POCE (SPOCE) appliquée à l'édition semisélective des satellites C3 et C4 du glutamate. L'impulsion d'inversion ^{13}C de la séquence POCE est remplacée par deux impulsions d'angle θ_1 et θ_2 . Le temps entre l'impulsion 90° et la première impulsion ^{13}C , ainsi que le temps entre la deuxième impulsion ^{13}C et le début de l'acquisition, est égal à $1/2J_{\text{CH}}$. Le temps entre les deux impulsions ^{13}C est égal à $1/2\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$, où $\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$ est l'écart de fréquence de résonance entre les carbones C3 et C4 du glutamate. La fréquence d'émission ^{13}C est choisie égale à la fréquence de résonance du C4.

Dans la séquence POCE classique, la séquence est répétée deux fois avec $(\theta_1, \theta_2) = (0^\circ, 0^\circ)$ (séquence A) et avec $(\theta_1, \theta_2) = (0^\circ, 180^\circ)$ (séquence B). Les satellites C3 et C4 sont inversés par rapport à la raie-mère dans la séquence B, mais ne sont pas inversés dans la séquence A. La différence (A-B) co-édite les satellites C3 et C4 avec le même signe. Dans la nouvelle méthode SPOCE, deux séquences sont ajoutées avec $(\theta_1, \theta_2) = (90^\circ, 90^\circ)$ (séquence C) et avec $(\theta_1, \theta_2) = (90^\circ, -90^\circ)$ (séquence D). Toutes les impulsions ^{13}C sont appliquées à la fréquence du glutamate C4 à 34,4 ppm. Les séquences C et D ont pour effet d'inverser sélectivement soit les satellites C3 soit les satellites C4 du glutamate.

Le fonctionnement de la séquence peut être analysé en utilisant le formalisme des opérateurs-produits. Examinons par exemple l'évolution d'un proton couplé à un carbone 13 pendant la séquence C. On définit deux référentiels tournants, l'un pour le proton, l'autre pour le carbone 13. Le proton est supposé à la résonance, donc fixe dans le référentiel proton. La fréquence d'émission ^{13}C est choisie à un offset $\Delta\nu$ de la résonance dans le référentiel carbone, où $\Delta\nu$ est une valeur arbitraire. On suppose de plus que toutes les impulsions sont appliquées selon $+x$ dans chacun des deux référentiels. Enfin, les effets du déplacement chimique en proton sont refocalisés par l'écho de spin et ne sont pas pris en compte dans le calcul.

Tout d'abord, pour des protons non couplés à un carbone 13, les impulsions ^{13}C n'ont aucun effet et la séquence se réduit à un simple écho de spin :

$$I_z \xrightarrow{90_x^\circ} -I_y \xrightarrow{1/2J+\tau/2} -I_y \xrightarrow{180_x^\circ} I_y \xrightarrow{1/2J+\tau/2} I_y$$

Pour un proton couplé à un carbone 13, l'impulsion d'excitation bascule l'aimantation I_z dans le plan transversal :

$$\sigma(0)^+ = -I_y$$

L'aimantation évolue ensuite pendant le délai $1/2J$ sous l'effet du couplage J :

$$\sigma(1/2J)^- = 2I_x S_z$$

La première impulsion 90° sur le canal ^{13}C donne :

$$\sigma(1/2J)^+ = -2I_x S_y$$

Ce terme représente un mélange de cohérences à zéro et double quantum qui n'évoluent pas sous l'effet du couplage J . Le déplacement chimique ^{13}C pendant le délai $\tau/2$ a pour effet :

$$\sigma(1/2J + \tau/2)^- = -2I_x \cdot [S_y \cos(\pi\tau\Delta\nu) - S_x \sin(\pi\tau\Delta\nu)]$$

L'impulsion proton 180° sur x ne change rien :

$$\sigma(1/2J + \tau/2)^+ = -2I_x \cdot [S_y \cos(\pi\tau\Delta\nu) - S_x \sin(\pi\tau\Delta\nu)]$$

et l'aimantation évolue de même pendant la deuxième moitié du délai τ :

$$\sigma(1/2J + \tau)^- = -2I_x \cdot [S_y \cos(2\pi\tau\Delta\nu) - S_x \sin(2\pi\tau\Delta\nu)]$$

La deuxième impulsion 90° ^{13}C appliquée selon l'axe x donne :

$$\sigma(1/2J + \tau)^+ = -2I_x \cdot [S_z \cos(2\pi\tau\Delta\nu) - S_x \sin(2\pi\tau\Delta\nu)]$$

Enfin, l'aimantation évolue pendant le temps $1/2J$:

$$\sigma(1/J + \tau) = -I_y \cos(2\pi\tau\Delta\nu) + I_x S_x \sin(2\pi\tau\Delta\nu)$$

Le terme $I_x S_x$ n'est pas détectable (cohérences à zéro et double quantum). Le signal détecté provient donc simplement de :

$$\sigma(1/J + \tau) = -I_y \cos(2\pi\tau\Delta\nu)$$

L'amplitude du signal des protons couplés au carbone 13 (satellites) est donc modulée par un terme $\cos(2\pi\Delta\nu)$. Deux cas particuliers sont intéressants :

Premier cas : $\Delta\nu = 0 \Rightarrow \sigma(1/J + \tau) = -I_y$

Par conséquent, si l'aimantation ^{13}C est à la résonance, les satellites du protons couplés à un carbone 13 sont inversés par rapport à la raie-mère *quelle que soit la valeur de τ* .

Deuxième cas : $\tau = \frac{1}{2\Delta\nu} \Rightarrow \sigma(1/J + \tau) = I_y$

Donc, si $\Delta\nu$ est non-nul et si τ est choisi égal à $1/(2\Delta\nu)$, les satellites des protons couplés sont détectés en phase par rapport à la raie-mère.

Dans le cas du glutamate, la fréquence ^{13}C est placée sur le glutamate C4 et on choisit $\tau = 1/\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$. De cette manière, les satellites du glutamate C4 sont inversés par rapport à la raie-mère (premier cas) et les satellites du glutamate C3 ne sont pas inversés (deuxième cas). Tout se passe comme si, bien que le délai τ soit du même ordre que $1/J_{\text{CH}}$, le couplage scalaire pouvait être négligé pendant ce délai. L'impulsion $90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ se comporte alors comme une impulsion semisélective classique [Plateau-1982] [Hore-1983] sous l'effet du déplacement chimique. Cette interprétation intuitive est en réalité rigoureusement exacte puisque les termes transverses de l'opérateur densité pendant le délai τ se réduisent à des cohérences à zéro et double quantum qui n'évoluent pas sous l'effet du couplage J.

On montre de même qu'à la fin de la séquence D, on a :

$$\sigma(1/J + \tau) = I_y \cos(2\pi\tau\Delta\nu)$$

Lorsque la fréquence d'émission est placée à la fréquence du glutamate C4 et que $\tau = 1/\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$, la séquence D inverse donc les satellites C3, mais pas les satellites C4. L'effet

des quatre séquences A, B, C, D sur les satellites C3 et C4 du glutamate est résumé dans le tableau suivant qui donne le signe des satellites C3 et C4 par rapport aux raies mères :

Séquence	satellites C3	satellites C4
A : $(\theta_1, \theta_2) = (0^\circ, 0^\circ)$	+	+
B : $(\theta_1, \theta_2) = (0^\circ, 180^\circ)$	-	-
C : $(\theta_1, \theta_2) = (90^\circ, 90^\circ)$	+	-
D : $(\theta_1, \theta_2) = (90^\circ, -90^\circ)$	-	+

La dernière étape de SPOCE consiste à combiner les spectres A,B,C,D de manière à éditer sélectivement soit les satellites C4, soit les satellites C3. La différence (A-B) supprime les raies-mères et édite les satellites C3 et C4 en phase l'un par rapport à l'autre. La différence (C-D) supprime également les raies-mères mais édite les satellites C3 et C4 en opposition de phase l'un par rapport à l'autre. La combinaison (A-B+C-D) édite uniquement les satellites C3 et la combinaison (A-B-C+D) uniquement les satellites C4 (Figure 27). Par conséquent, les mêmes acquisitions A, B, C, D permettent d'obtenir séparément le signal des satellites C3 et C4.

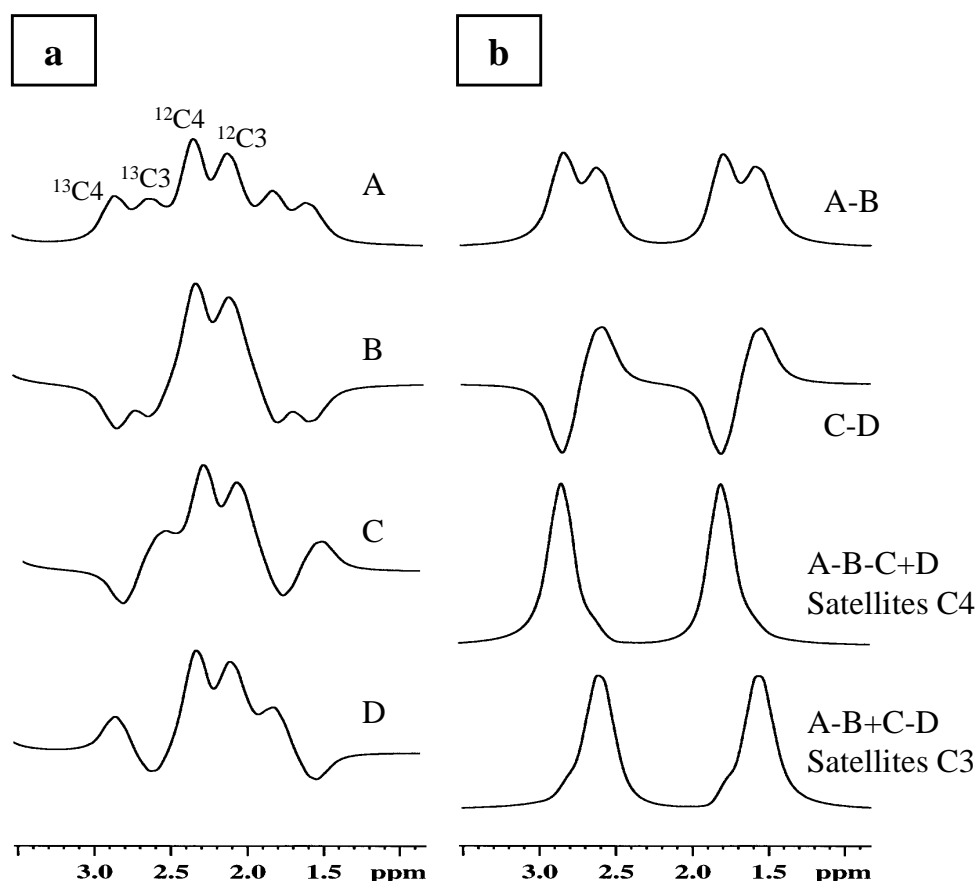


Figure 27. Simulation avec le logiciel Bruker NMRSIM[®] de l'effet de la séquence SPOCE sur le glutamate enrichi en ^{13}C à 50% sur les carbones C3 et C4. La largeur de raie est de 15 Hz. (a) spectres obtenus avec les séquences A, B, C, D de la méthode SPOCE. Les séquences A et B correspondent aux deux acquisitions de la méthode POCE, avec les satellites C3 et C4 respectivement en phase et inversés par rapport aux raies-mères. (b) Spectres édités obtenus en combinant les spectres A, B, C, D. La différence A-B correspond à l'édition POCE classique et les satellites C3 et C4 sont coédités avec la même phase. La différence C-D édite les satellites C3 et C4 en opposition de phase. Finalement la combinaison A-B-C+D édite uniquement les satellites C4 et la combinaison A-B+C-D édite uniquement les satellites C3.

Calcul de l'effet des inhomogénéités de B_1 sur le canal ^{13}C

Idéalement, les impulsions ^{13}C θ_1 et θ_2 de la méthode SPOCE sont parfaitement calibrées. Cependant, lorsque ces impulsions sont émises avec une antenne de surface, l'angle effectif varie en fonction de la distance par rapport à l'antenne. Il est alors légitime de se demander dans quelle mesure une variation des angles θ_1 et θ_2 modifie l'efficacité de la méthode SPOCE.

Pour simplifier, on considère uniquement le cas où l'aimantation du carbone 13 est à la résonance dans le référentiel tournant ^{13}C (i.e. $\Delta\nu=0$). On a comme précédemment :

$$\sigma(0)^+ = -I_y \text{ puis } \sigma\left(\frac{1}{2J}\right)^- = 2I_x S_z$$

La première impulsion ^{13}C d'angle θ_1 a pour effet :

$$\sigma\left(\frac{1}{2J}\right)^+ = 2I_x S_z \cos(\theta_1) - 2I_x S_y \sin(\theta_1)$$

Le deuxième terme (mélange de cohérences à zéro et double quantum) n'évolue pas sous l'effet du couplage J, et le premier terme évolue sous l'effet du couplage J pendant $\tau/2$:

$$\sigma_1\left(\frac{1}{2J} + \frac{\tau}{2}\right)^- = \cos(\theta_1) \cdot \left[2I_x S_z \cos\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) + I_y \sin\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) \right] - 2I_x S_y \sin(\theta_1)$$

L'impulsion proton 180° inverse le signe de I_y :

$$\sigma\left(\frac{1}{2J} + \frac{\tau}{2}\right)^+ = \cos(\theta_1) \cdot \left[2I_x S_z \cos\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) - I_y \sin\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) \right] - 2I_x S_y \sin(\theta_1)$$

L'aimantation évolue sous l'effet du couplage J pendant la deuxième partie du délai τ :

$$\begin{aligned} \sigma\left(\frac{1}{2J} + \tau\right)^- &= \cos(\theta_1) \cos\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) \cdot \left[2I_x S_z \cos\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) + I_y \sin\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) \right] \\ &\quad - \cos(\theta_1) \sin\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) \cdot \left[I_y \cos\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) - 2I_x S_z \sin\left(\pi J \frac{\tau}{2}\right) \right] - 2I_x S_y \sin(\theta_1) \\ &= 2I_x S_z \cos(\theta_1) - 2I_x S_y \sin(\theta_1) \end{aligned}$$

On retrouve bien que :

$$\sigma\left(\frac{1}{2J}\right)^+ = \sigma\left(\frac{1}{2J} + \tau\right)^-$$

c'est-à-dire que le terme $I_x S_z$ n'évolue pas pendant l'écho de spin proton.

La deuxième impulsion ^{13}C d'angle θ_2 conduit à :

$$\begin{aligned}
\sigma\left(\frac{1}{2J} + \tau\right)^+ &= \cos(\theta_1) \cdot [2I_x S_z \cos(\theta_2) - 2I_x S_y \sin(\theta_2)] - \sin(\theta_1) \cdot [2I_x S_y \cos(\theta_2) + 2I_x S_z \sin(\theta_2)] \\
&= 2I_x S_z \cdot [\cos(\theta_1)\cos(\theta_2) - \sin(\theta_1)\sin(\theta_2)] - 2I_x S_y \cdot [\cos(\theta_1)\sin(\theta_2) + \sin(\theta_1)\cos(\theta_2)] \\
&= 2I_x S_z \cos(\theta_1 + \theta_2) - 2I_x S_y \sin(\theta_1 + \theta_2)
\end{aligned}$$

Enfin, le terme $I_x S_z$ évolue sous l'effet du couplage J :

$$\sigma\left(\frac{1}{J} + \tau\right) = I_y \cos(\theta_1 + \theta_2) - 2I_x S_y \sin(\theta_1 + \theta_2)$$

Le terme $I_x S_y$ n'est pas détectable et correspond à une perte de signal.

En supposant que l'angle d'impulsion ^{13}C calibré normalement à 90° vaut en réalité θ , le signal détecté pour les quatre séquences A, B, C, D de SPOCE, est :

$$\text{Séquence A : } (\theta_1 = 0; \theta_2 = 0) \Rightarrow \sigma = I_y$$

$$\text{Séquence B : } (\theta_1 = 0; \theta_2 = 2\theta) \Rightarrow \sigma = I_y \cos(2\theta)$$

$$\text{Séquence C : } (\theta_1 = \theta; \theta_2 = \theta) \Rightarrow \sigma = I_y \cos(2\theta)$$

$$\text{Séquence D : } (\theta_1 = \theta; \theta_2 = -\theta) \Rightarrow \sigma = I_y$$

Le signal des satellites du glutamate C4 obtenu par (A-B-C+D) est :

$$\sigma = I_y \cdot [2 - 2\cos(2\theta)] = I_y \cdot 4\sin^2(\theta)$$

La perte de signal est : $4 - 4\sin^2(\theta) = 4\cos^2(\theta)$. Par exemple, si $\theta=45^\circ$ au lieu de 90° , la perte de signal est de 50%. En revanche, avec la combinaison (A-B+C-D) qui correspond à l'édition sélective des satellites du glutamate C3, on obtient toujours un signal nul quelle que soit la valeur de l'angle θ , ce qui signifie que la sélectivité de l'édition n'est pas modifiée.

En conclusion, une mauvaise calibration des impulsions ^{13}C entraîne une perte d'intensité globale des satellites édités par création de cohérences à zéro et double quantum non détectables. En revanche, la sélectivité de la méthode SPOCE n'est pas modifiée : il n'y a pas contamination des satellites édités par les satellites non édités.

I.2.4. Matériels et méthodes

Fantôme de glucose et préparation animale

Une sphère de 1,8 ml contenant une solution de 500 mM de glucose dans du D₂O pur à 99,9% a été utilisée pour la validation de la méthode SPOCE *in vitro*. L'enrichissement du glucose sur le carbone 1 a été ajusté à 50% par un mélange équimolaire de glucose non marqué et de [1-¹³C]glucose enrichi à 100% (ISOTECH Inc.).

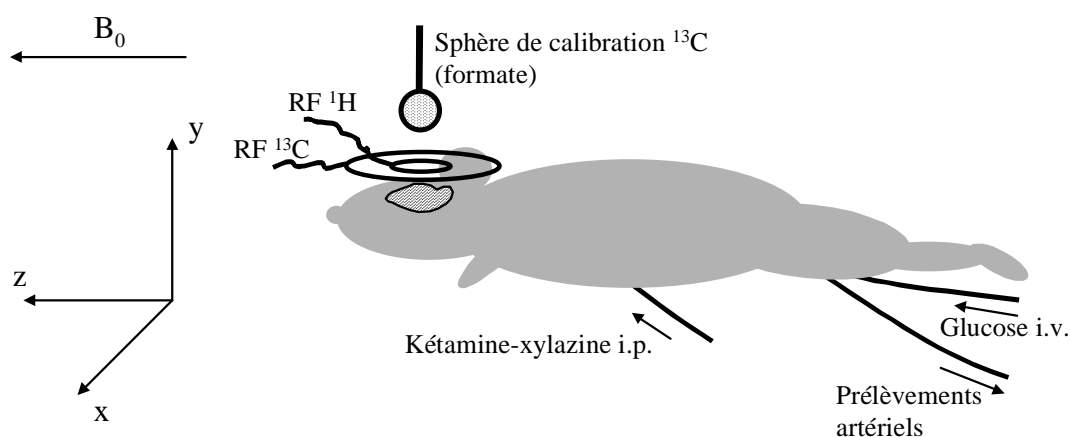


Figure 28. Dispositif expérimental pour les mesures de SRM avec la séquence SPOCE chez le rat. Les deux sondes ¹H et ¹³C sont positionnées au dessus du crâne de l'animal après rétraction de la peau et des tissus sous-jacents. La sphère de calibration ¹³C est placée à 1,5 cm au dessus des sondes. Deux cathéters fémoraux, l'un artériel et l'autre veineux, sont posés pour permettre respectivement les prélèvements sanguins et la perfusion de glucose marqué. Une cathéter intrapéritonéal est utilisé pour l'injection de l'anesthésique. Le repère indique le positionnement du rat par rapport aux axes x, y, z communément utilisés en RMN et par rapport au champ B₀.

Un rat Sprague-Dawley mâle (300 g), mis à jeun la veille, a été anesthésié avec un mélange de kétamine (100 mg/kg ip puis 50 mg/kg toutes les 45 minutes) et de xylazine (5 mg/kg ip puis 2,5 mg/kg toutes les 45 minutes). La veine fémorale gauche a été cathétérisée avec du PE 50 pour la perfusion de glucose. La peau du crâne a été retirée et le crâne nettoyé de tous les tissus entre les crêtes temporales avec de l'eau oxygénée (20%). L'animal a été placé dans un support amagnétique spécialement construit et sa tête maintenue en place par une barre à dents et des barres d'oreilles. Une feuille de plastique rigide rectangulaire a été insérée entre le crâne et l'antenne pour éviter le contact de l'humidité avec la sonde détectrice (le contact de liquides physiologiques modifie les caractéristiques électriques de la sonde). Le centre des sondes concentriques ¹H et ¹³C a été positionné environ 2 mm en arrière du

bregma. Un soin particulier a été pris pour positionner la tête horizontalement dans le support.

Pour l'acquisition des cinétiques de marquage, la concentration de glucose plasmatique a été augmentée rapidement de l'euglycémie (1,1 g/l) à environ 4 g/l par un bolus de 3,5 ml/kg de [1-¹³C]glucose enrichi à 100%. Le bolus a été perfusé à une vitesse diminuant de manière exponentielle sur 9 minutes, et a été suivi par une perfusion continue à 3 ml.kg⁻¹.h⁻¹ jusqu'à la fin de l'expérience. Ce protocole de perfusion a été optimisé auparavant hors aimant pour réaliser un plateau hyperglycémique stable.

Spectroscopie RMN

Tous les spectres ont été acquis sur un spectromètre Avance relié à un aimant 3T corps entier (Oxford). Un tunnel-tête de gradients avec un temps de montée de 170 μs et une intensité maximale de 25 mT/m a été utilisé pour le déphasage des signaux parasites et la localisation. La sonde fabriquée spécialement et intégrée au support du rat consistait en une boucle circulaire accordée à la fréquence du proton (diamètre 12 mm) pour l'émission et la réception, et une boucle ¹³C concentrique (diamètre 30 mm) pour l'inversion ¹³C et le découplage.

La même séquence d'impulsions SPOCE a été utilisée pour éditer les satellites des carbones C1α et C1β du glucose *in vitro* et les satellites des carbones C3 et C4 du glutamate *in vivo*. Seules les valeurs de $1/2J_{CH}$ et $\tau=1/2\Delta\nu$ dépendent du système de spins étudié. Les carbones C1α et C1β du glucose résonnent respectivement à 92,7 et 96,6 ppm ($\Delta\nu=125$ Hz à 2,94T) avec des constantes de couplage hétéronucléaires de valeur $J_{CH}=162$ Hz et $J_{CH}=170$ Hz. Les carbones C3 et C4 du glutamate résonnent à 27,7 ppm et 34,4 ppm ($\Delta\nu=201$ Hz à 2,94T) avec $J_{CH}=127$ Hz et $J_{CH}=130$ Hz. (Ces valeurs ont été mesurées précisément sur un fantôme de 500 mM glutamate en abondance naturelle par détection directe en ¹³C). Par conséquent, les délais de la séquence ont été fixés à $1/2J=3,0$ ms et $\tau=4,0$ ms pour le glucose (soit TE=10,0 ms), et $1/2J=4,0$ ms et $\tau=2,5$ ms pour le glutamate (soit TE=10,5 ms). Les valeurs exactes de J_{CH} et $\Delta\nu$ ont été vérifiées par détection ¹³C directe sur des fantômes de glucose marqué et de glutamate en abondance naturelle. Dans les deux cas, la fréquence d'émission ¹³C était placée sur la résonance de plus haute fréquence (C1β pour le glucose, C4 pour le glutamate). Des gradients de déphasage de 2.5 ms à 70% de la valeur maximale ont été

placés dans l'écho de spin symétriquement avant θ_1 et après θ_2 pour éliminer l'aimantation non refocalisée.

Pour les expériences *in vivo*, deux images de référence sagittale et coronale en écho de gradient ont été acquises afin de choisir le volume d'intérêt pour la spectroscopie. Une première image sagittale (5 tranches de 3 mm, matrice 128x128, FOV 8x8 cm) a permis de positionner les tranches pour l'image transverse. L'image transverse (9 tranches de 2 mm, 256x192, FOV 3x3 cm) a été acquise avec une séquence d'inversion-récupération pour obtenir un contraste T_1 (temps d'inversion 550 ms, TR 1,7 s). Le volume d'intérêt de 10x6x10 mm (dans les directions x,y,z) centré sur le corps calleux englobait la majeure partie du cerveau. La localisation par suppression du volume externe (Outer Volume Suppression ou OVS) consistait à saturer six tranches adjacentes au voxel en $-x$, $+x$, $-y$, $+y$, $-z$, $+z$ grâce à six impulsions 90° sélectives (impulsion sech tronquée à 5%, 2 ms, largeur de bande 6000 Hz) suivies par des gradients de déphasage. Bien que les impulsions sech 'full passage' utilisées comme 90° ne soient pas adiabatiques, leur profil fréquentiel se dégrade peu lorsque l'angle d'excitation varie. La puissance des impulsions d'OVS a été calibrée séparément en x,y et z sur un profil grâce à l'ajout gradient de lecture pendant l'acquisition. L'homogénéité du champ B_0 a été ajustée manuellement (shims X,Y, Z et Z^2) pour obtenir une largeur de raie sur l'eau de 15 Hz environ. La méthode SWAMP a été utilisée pour obtenir une suppression d'eau adiabatique [de Graaf-1998].

Calibration de la puissance et de la fréquence des impulsions ^{13}C

La puissance et la fréquence des impulsions ^{13}C (impulsion rectangulaire de 300 μs) doivent être calibrées précisément, malgré l'absence d'un signal ^{13}C endogène suffisamment intense dans le cerveau pour effectuer une calibration directe. Pour la calibration de puissance, une sphère de 1 ml contenant une solution de $[1-^{13}\text{C}]\text{formate}$ a servi de référence externe. La sphère a été positionnée à 1,5 cm au-dessus des sondes, suffisamment loin du volume cérébral d'intérêt pour ne pas perturber l'homogénéité du champ B_0 . La puissance de l'impulsion 90° ^{13}C sur le volume d'intérêt a été déduite de cette calibration de l'impulsion 90° sur le signal externe en ajoutant 8,5 dB. Cet écart relatif de 8,5 dB, constant si le volume d'intérêt est positionné toujours à la même distance de la sonde, avait été mesuré auparavant *in vitro*. La fréquence ^{13}C du glutamate C4 *in vivo* a été déduite de la fréquence ^1H de la créatine à 3,0 ppm après mesure du rapport des fréquences *in vitro* : $\text{bf2}(\text{gluC4})/\text{bf1}(\text{Cr})=3,9768135$ où bf2

est la fréquence ^{13}C du glutamate C4 et bf1 la fréquence ^1H de la créatine). Le découplage large-bande a été réalisé avec un train d'impulsions WALTZ-8 (longueur de l'élément 90° : $300\ \mu\text{s}$) appliquée en continu sur le canal ^{13}C pendant l'acquisition [Shaka-1983].

Entrelaçage et analyse des données

Les scans individuels A, B, C, D de la méthode SPOCE ont été entrelacés en utilisant les possibilités de “pipeline filter” du système Bruker Avance. Cet entrelaçage est indispensable pour obtenir une bonne soustraction des raies ^{12}C ainsi que des résiduels de l'eau et des lipides présents sur les spectres avant soustraction. Les cinétiques de marquage *in vivo* ont été acquises par blocs de 128 scans (plus deux scans perdus pour atteindre l'état stationnaire) avec $\text{TR}=2,5\ \text{s}$, soit une résolution temporelle de 5,5 mn. Ces 128 scans entrelacés ont été automatiquement séparés et sommés en 4 blocs de 32 scans chacun, correspondant aux séquences A, B, C, D. Les spectres édités ont été obtenus en combinant directement les signaux temporels de décroissance d'induction libre avant transformée de Fourier. L'intensité des satellites C3 et C4 au cours du temps a été mesurée en imprimant les spectres et en mesurant à la règle la hauteur des pics à 2,09 ppm et 2,33 ppm après avoir tracé manuellement la ligne de base. Un élargissement lorentzien de 5 Hz a été appliqué.

Découplage

Le découplage pendant l'acquisition permet de gagner un facteur deux en rapport signal-sur-bruit. Il pose cependant d'importants problèmes techniques liés à la sensibilité de la chaîne de mesure aux perturbations électromagnétiques. Il s'agit en effet de détecter un signal RMN extrêmement faible (de l'ordre du microvolt) tout en appliquant aux bornes de l'antenne ^{13}C une tension de découplage de plusieurs centaines de volts. Si aucune précaution n'est prise, le bruit généré par les interférences de la RF de découplage avec la chaîne de mesure rend impossible la détection du signal RMN. Ce bruit prend notamment la forme de ‘spikes’ dans le domaine temporel. Pour éviter ces interférences, des filtres et des blindages doivent être placés à différents points de la chaîne de mesure afin de minimiser le couplage électromagnétique entre la chaîne d'émission ^{13}C et la chaîne de réception proton. La Figure 29 montre la chaîne de mesure utilisée pour les expériences POCE sur le cerveau de rat.

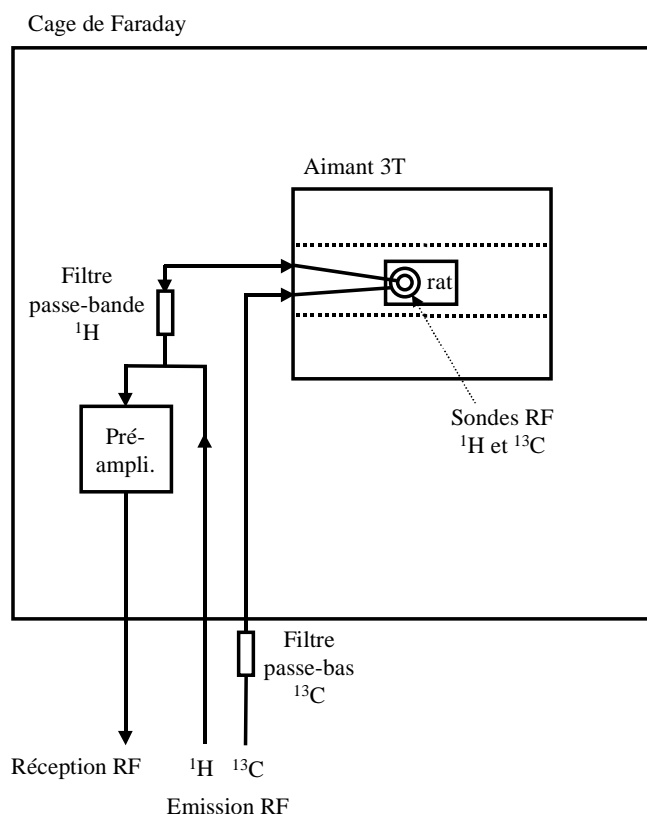


Figure 29. Schéma de l'émission et de la réception radiofréquence pour la séquence SPOCE. Un filtre basse-bas est inséré après l'amplificateur d'émission ^{13}C pour éliminer le bruit émis à la fréquence du proton. Un filtre passe-bande à la fréquence du proton est inséré avant le préamplificateur (préampli) à la réception pour éliminer la HF à la fréquence ^{13}C ramenée par l'antenne proton.

Deux filtres passe-bas " ^{13}C -pass/ ^1H -stop" (Bruker) sont placés à la sortie de l'amplificateur d'émission ^{13}C pour éliminer le bruit de l'ampli à la fréquence du proton. Un filtre passe-bande " ^1H -pass" (Trilitic) est placé juste à l'entrée du préamplificateur pour éliminer la RF à la fréquence du ^{13}C ramenée dans le câble de réception proton. Un filtre passe-bande ^1H est également ajouté à la sortie du préamplificateur. Les deux câbles ^{13}C et ^1H connectés aux deux antennes ^1H et ^{13}C sont blindés par de la tresse métallique et positionnés avec un angle de 90° l'un par rapport à l'autre à la sortie des sondes. Enfin, le préamplificateur est protégé des interférences par une toile de cuivre faisant office de cage de Faraday rudimentaire. Avec tous ces éléments, le découplage sur le cerveau de rat ne rajoute pas de bruit supplémentaire.

I.2.5. Résultats

I.2.5.1. Validation *in vitro*

La séquence SPOCE a d'abord été évaluée *in vitro* sur une sphère contenant une solution de glucose enrichi en ^{13}C sur le carbone 1. Contrairement au glutamate, le glucose marqué présente l'avantage de fournir à 3 T deux paires de satellites bien résolus correspondant aux résonances des protons liés au $\text{C1}\alpha$ et $\text{C1}\beta$ à 5,23 ppm et 4,63 ppm respectivement. En adaptant les délais de la séquence d'acquisition, les satellites $\text{C1}\alpha$ et $\text{C1}\beta$ peuvent être édités sélectivement de la même manière que les satellites C3 et C4 du glutamate. Le glucose marqué sur le C1 permet ainsi d'évaluer la qualité de l'édition semisélective *in vitro* dans des conditions optimales de résolution spectrale et de rapport signal-sur-bruit.

La Figure 30 montre les spectres acquis sans découplage ^{13}C sur le fantôme de glucose marqué avec la méthode SPOCE. La Figure 30a correspond à l'édition POCE classique avec la différence A-B. Les satellites $\text{C1}\alpha$ et $\text{C1}\beta$ sont co-édités avec le même signe. En prenant la différence C-D (Figure 30b), les satellites sont également co-édités, mais avec des signes opposés. Le spectre de la Figure 30c est la somme des deux spectres précédents (combinaison A-B+C-D) et montre l'édition sélective des satellites $\text{C1}\alpha$. De même, le spectre de la Figure 30d résulte de la soustraction des deux premiers spectres (combinaison A-B-C+D) et montre l'édition sélective des satellites $\text{C1}\beta$. L'excellente sélectivité de la méthode SPOCE est démontrée par la très faible contamination des satellites édités par les satellites non-édités sur les Figure 30c et Figure 30d. Le petit signal résiduel de soustraction à 4,8 ppm provient du pic de l'eau.

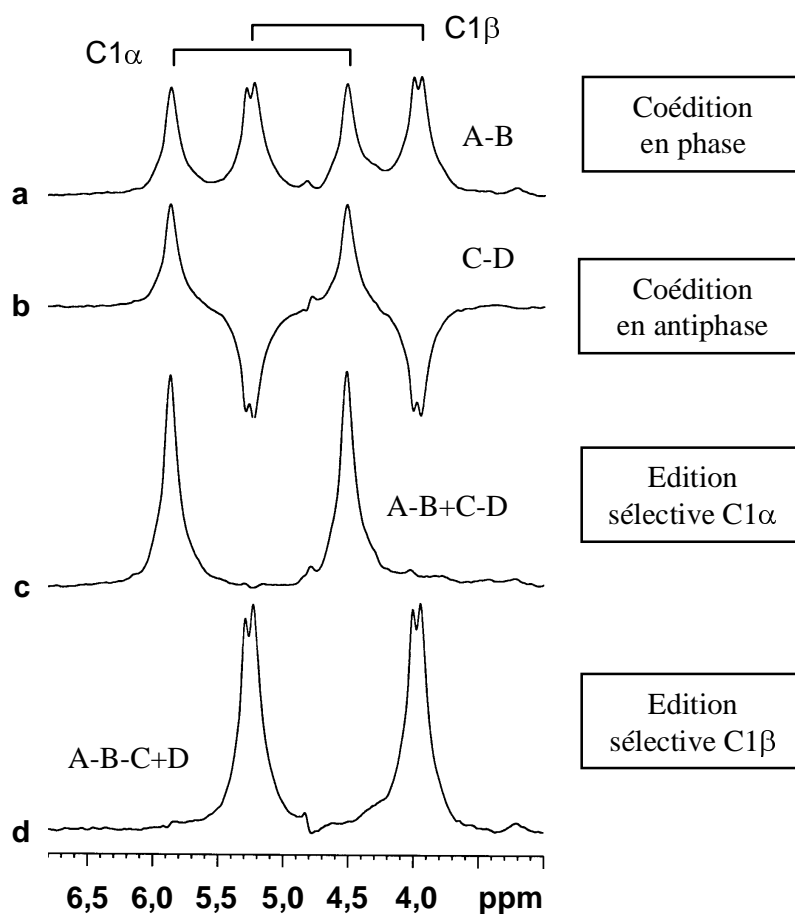


Figure 30. Validation de la méthode SPOCE sur un fantôme de glucose enrichi en ^{13}C sur le carbone 1 sans découplage pendant l'acquisition. Les quatre spectres correspondent à différentes combinaisons des séquences A, B, C, D. (a) Edition des satellites $\text{C1}\alpha$ et $\text{C1}\beta$ en phase par A-B (POCE). (b) Edition des satellites $\text{C1}\alpha$ et $\text{C1}\beta$ en antiphase par C-D. (c) Edition sélective des satellites $\text{C1}\alpha$ par A-B+C-D. (d) Edition sélective des satellites $\text{C1}\beta$ par A-B-C+D.

I.2.5.2. Validation *in vivo*

La Figure 31 montre l'édition sélective avec la méthode SPOCE des satellites C3 et C4 du glutamate *in vivo* avec découplage pendant l'acquisition. Ces spectres acquis sur un volume de 600 μl dans le cerveau de rat correspondent à une accumulation de 22 minutes centrée 70 minutes après le début de la perfusion de glucose marqué. Sur la Figure 31a, les satellites C3 et C4 sont coédités avec le même signe, et sur la Figure 31b avec des signes opposés. La somme et la différence de ces deux spectres donne respectivement l'édition sélective des satellites C3 à 2,09 ppm et des satellites C4 à 2,33 ppm (Figure 31c et Figure 31d). Les spectres édités comportent également des signaux plus faibles, désignés par des astérisques, provenant du lactate et de l'alanine vers 1,4 ppm, de l'aspartate vers 2,8 ppm, du GABA et de

la créatine vers 3,0 ppm. L'identification de ces résonances a été faite à partir des spectres obtenus à 9,4T après perfusion de glucose marqué [Pfeuffer-1999a].

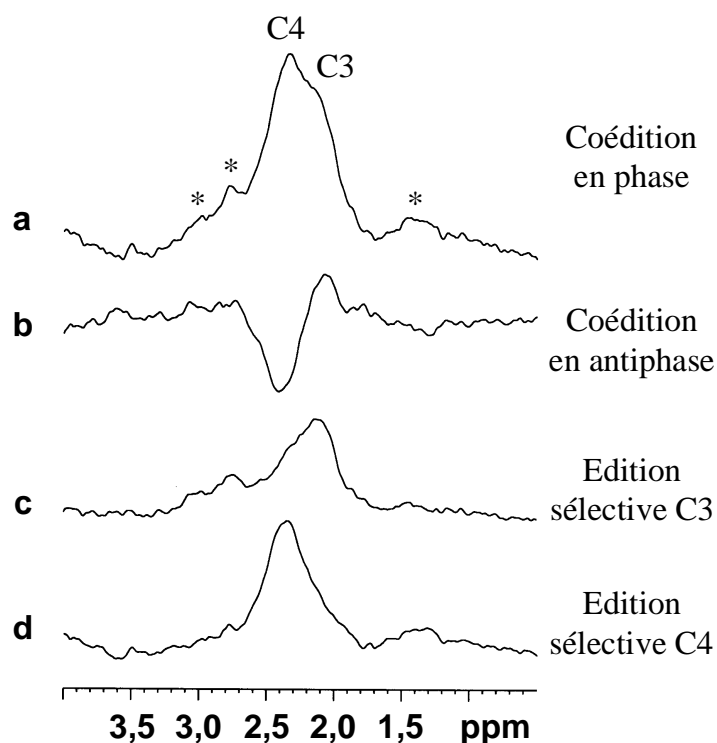


Figure 31. Validation de la méthode SPOCE in vivo sur le cerveau d'un rat anesthésié pendant une perfusion de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Les quatre spectres découplés du glutamate correspondent à différentes combinaisons des séquences d'acquisition A, B, C, D. (a) Coédition des satellites C3 et C4 en phase par A-B (POCE). (b) Coédition des satellites C3 et C4 en antiphase par C-D. (c) Edition sélective des satellites C3 par A-B+C-D. (d) Edition sélective des satellites C4 par A-B-C+D. Le seul post-traitement a consisté en un élargissement lorentzien de 5 Hz. Les spectres résultent de 22 minutes d'accumulation centrée 70 minutes après le début de la perfusion de glucose. Les étoiles désignent des résonances plus faibles attribués au lactate et à l'alanine (1,3 ppm), à l'aspartate (2,8 ppm), à la créatine et au GABA (3,0 ppm) selon [Pfeuffer-1999a].

La Figure 32 montre les cinétiques de marquage des satellites C3 et C4 sur un cerveau de rat avec une résolution temporelle de 5,5 minutes. Les deux séries de spectres ont été acquises simultanément pendant la même perfusion de glucose marqué. Il apparaît clairement que le pic de glutamate C3, marqué au deuxième tour du cycle de Krebs, augmente plus lentement que le glutamate C4. Un ajustement monoexponentiel à trois paramètres de la hauteur du pic en fonction du temps (Figure 33) donne une constante de temps de 33 minutes pour le C4 et de 62 minutes pour le C3. En réalité, ces courbes ne sont pas des monoexponentielles et doivent être ajustées par un modèle métabolique plus complexe (voir partie II.3.).

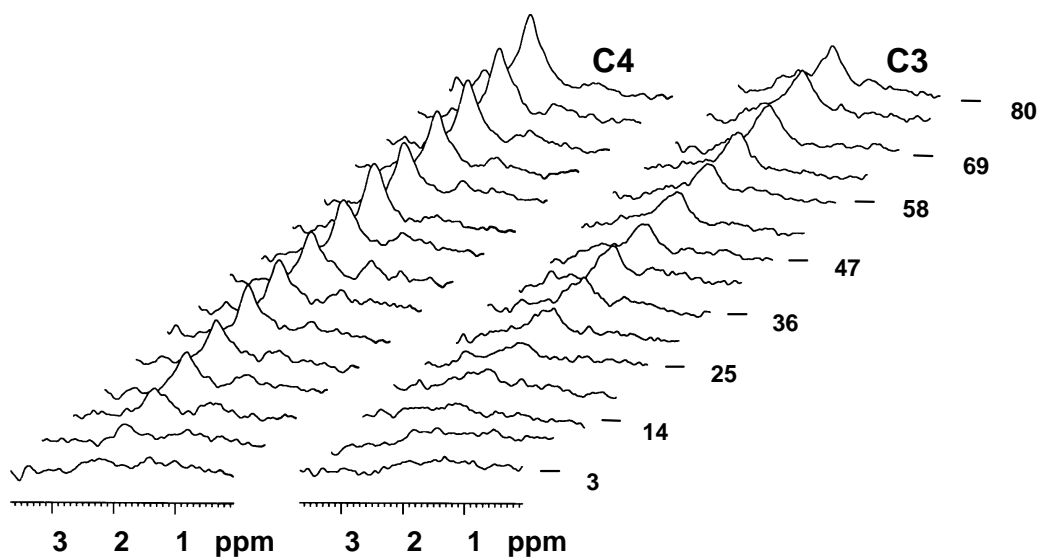


Figure 32. Séries de spectres SPOCE acquis sur le cerveau d'un rat anesthésié pendant une perfusion de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et montrant le marquage progressif du glutamate C3 et C4 au cours du temps. Les chiffres de droite, précisés un spectre sur deux, indiquent le temps correspondant au milieu de l'acquisition du spectre en minutes depuis le début de la perfusion de glucose marqué. Seul un élargissement lorentzien de 10 Hz a été appliqué aux données.

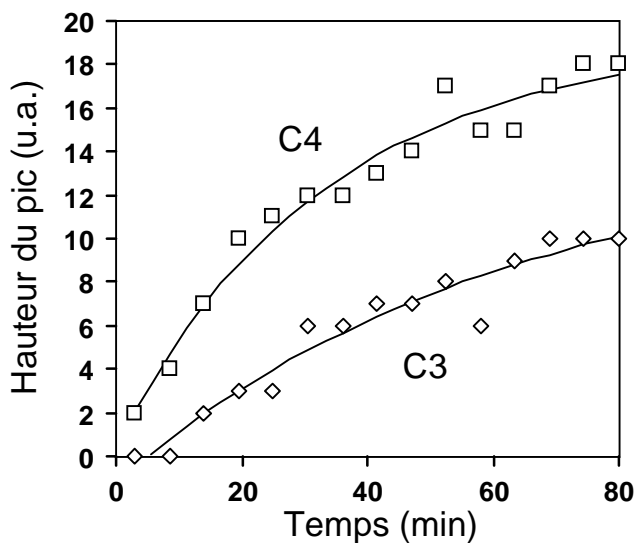


Figure 33. Décours temporel du marquage du glutamate C3 et C4 obtenus avec la méthode SPOCE sur le cerveau d'un rat anesthésié (même expérience que la Figure 32). Les hauteurs des pics ont été mesurées après traçage manuel d'une ligne de base. Les traits pleins représentent l'ajustement des données par moindres carrés par une fonction monoexponentielle.

I.2.6. Discussion

La méthode SPOCE proposée permet d'éditer séparément deux résonances de protons liés au ^{13}C , même si ces résonances se superposent, à condition que les résonances des deux carbones liés à ces protons soit suffisamment séparées en fréquence. La méthode a été validée *in vitro* en éditant séparément les satellites C1 α et C1 β du glucose enrichi sur le carbone 1. La détection séparée des satellites C3 et C4 du glutamate a rendu possible la mesure simultanée des cinétiques de marquage des carbones C3 et C4 du glutamate dans le cerveau de rat à 3 T avec une résolution temporelle de 5,5 minutes.

La méthode SPOCE peut être vue comme la combinaison de deux modules distincts de spectroscopie par différence, un module SQ (Simple Quantum) correspondant aux séquences A et B, et un module ZDQ (Zéro et Double Quantum) correspondant aux séquences C et D. Le module SQ est identique à la séquence POCE classique et n'implique que des cohérences à simple quantum. Il co-édite les satellites C3 et C4 avec le même signe, quelle que soit la valeur du délai τ . En revanche, dans le module ZDQ, la fréquence d'émission ^{13}C ainsi que la valeur du délai τ ($1/2\Delta\nu_{\text{C3-C4}}$) doivent être ajustés précisément afin de co-éditer les satellites C3 et C4 avec des signes opposés. En ajoutant et en soustrayant les spectres par différence issus des modules SQ et ZDQ, on obtient soit les satellites C3 soit les satellites C4 avec une efficacité de 100%.

Les séquences C et D sont identiques à la séquence classique HMQC. Parce que les impulsions ^{13}C sont appliquées à la fréquence du glutamate C4, les satellites C4 sont toujours édités par ZDQ avec une amplitude maximale, quelle que soit la valeur du délai τ . Au contraire, l'amplitude des satellites C3 est modulée par un facteur $\cos(2\pi\tau\Delta\nu_{\text{C3-C4}})$ parce que l'efficacité de la conversion des cohérences à zéro et double quantum en cohérences à simple quantum par la deuxième impulsion ^{13}C varie avec τ .

Calibration de la fréquence d'émission ^{13}C

L'ajustement très précis de la fréquence d'émission ^{13}C n'est pas nécessaire avec la méthode POCE classique car l'impulsion d'inversion ^{13}C est une impulsion large-bande. En revanche, dans la méthode SPOCE, la calibration précise de la fréquence d'émission ^{13}C est particulièrement importante si l'on se souvient que l'impulsion d'inversion ^{13}C dans le module

ZDQ se comporte comme une impulsion semisélective $\theta_1\text{-}\tau\text{-}\theta_2$ (§ I.2.3.). Si la fréquence d'émission ^{13}C n'est pas égale à la fréquence du glutamate C4, la semisélectivité de la méthode SPOCE n'est plus assurée. Dans le cas extrême où la fréquence d'émission ^{13}C se situe exactement entre la fréquence du glutamate C4 et du glutamate C3, le module ZDQ n'édite ni le glutamate C3, ni le glutamate C4 car le terme en $\cos(2\pi\Delta\nu)$ est nul. La méthode SPOCE se réduit alors au module SQ identique à la méthode POCE classique, avec le bruit supplémentaire ajouté par le module ZDQ. La Figure 34 démontre la sélectivité de la méthode SPOCE *in vivo*. Le lactate marqué sur le carbone 3 est coédité avec le glutamate C4 et n'est pas visible sur les spectres du glutamate C3. Ceci est cohérent avec la valeur du déplacement chimique du carbone 3 du lactate, soit 21,0 ppm.

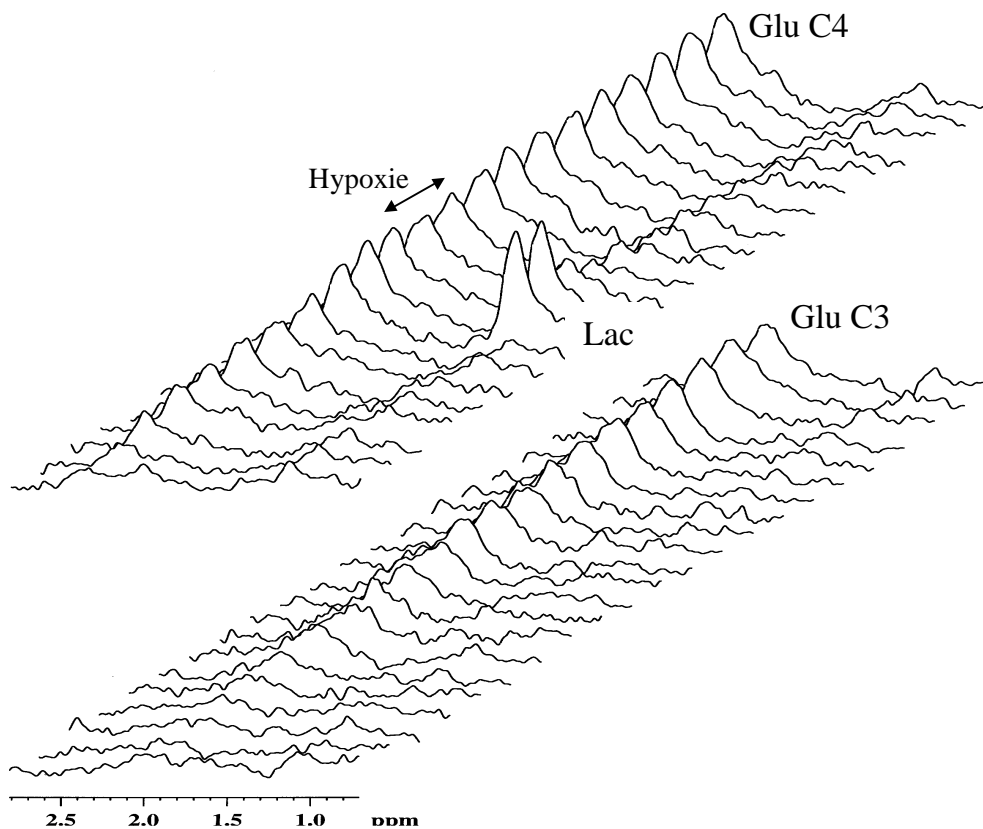


Figure 34. Séries de spectres SPOCE acquis sur le cerveau d'un rat anesthésié pendant une perfusion de $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{glucose}$ et montrant le marquage progressif du glutamate C3 et C4 au cours du temps. Le rat a subi une hypoxie transitoire pendant 10 minutes au cours de l'acquisition des spectres. Le pic de lactate correspondant à l'hypoxie est détecté uniquement sur les spectres du glutamate C4, démontrant la bonne sélectivité de la méthode SPOCE. Un ralentissement du marquage du glutamate C4 est visible pendant l'hypoxie, cohérent avec un arrêt du métabolisme oxydatif pendant cette période.

Découplage

Le découplage *in vivo* pendant l'acquisition pose d'importants problèmes techniques liés à l'émission RF à la puissance du ^{13}C pendant l'acquisition d'un signal très faible à la fréquence du proton. Si aucune précaution n'est prise pour limiter les interférences RF, du bruit supplémentaire est rajouté sur les spectres, rendant ces derniers inexploitable (Figure 35). Ces problèmes de bruit dû au découplage ont pu être surmontés pour les expériences chez le rat en insérant des filtres et en blindant les câbles et le préamplificateur, mais se sont révélés plus difficiles à résoudre chez le singe, à cause de la puissance émise plus importante et de la taille plus importante des sondes qui rayonnent à grande distance vers la chaîne de réception. Dans ce cas, il est possible de limiter ce rayonnement en plaçant le singe et les sondes à l'intérieur d'une cage de Faraday. Une telle cage a été construite et est actuellement en cours de test.

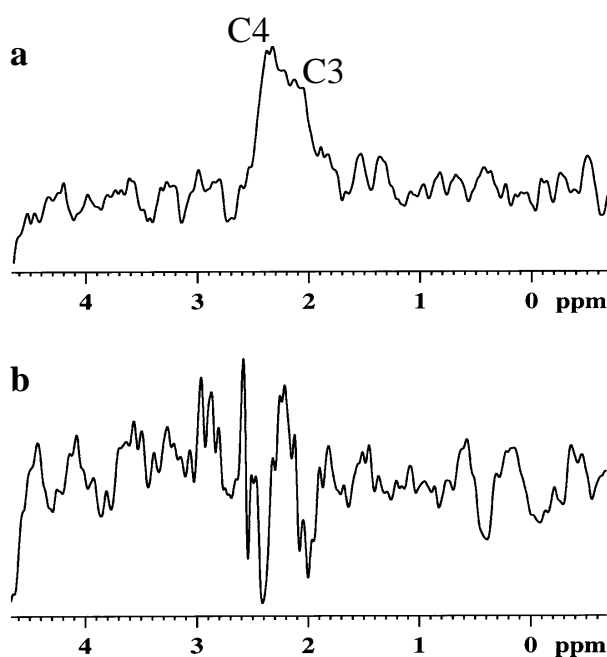


Figure 35. Conséquences du bruit supplémentaire dû au découplage pendant l'acquisition. (a) spectre POCE du glutamate C3 et C4 sur le striatum d'un babouin anesthésié sans bruit ajouté par le découplage. Le spectre correspond à 6 minutes d'acquisition sur un volume de 5 ml. Un élargissement lorentzien de 7 Hz a été appliqué. (b) Spectre similaire avec du bruit supplémentaire dû au découplage. La mesure des signaux C3 et C4 glutamate devient impossible.

Contamination des satellites du glutamate par la glutamine et le NAA

A champ magnétique supérieur à 4 T, où les résonances des satellites C3 et C4 du glutamate sont suffisamment résolues pour être mesurées directement à condition que le champ magnétique B_0 soit assez homogène, la méthode SPOCE pourrait être également utilisée pour supprimer la contamination des satellites du glutamate C4 (2,33 ppm) par ceux de la glutamine C4 (2,44 ppm) dont les carbones résonnent respectivement à 34,4 ppm et 31,3 ppm. A 4 T, l'écart de fréquence entre les satellites du glutamate C4 et ceux de la glutamine C4 est de moins de 20 Hz mais les deux carbones sont séparés de 130 Hz. La mesure simultanée des vitesses de marquage du glutamate C4 et de la glutamine C4 pourrait servir par exemple à déterminer la vitesse du cycle glutamate-glutamine entre les neurones et la glie dans des études fonctionnelles localisées. Il existe en effet de nombreux éléments montrant que la vitesse de ce cycle glutamate-glutamine serait directement proportionnelle à l'activité neuronale glutamatergique.

Il faut noter que la contamination du glutamate C4 par la glutamine C4, habituellement négligée car la glutamine est deux à trois fois moins concentrée et se marque plus lentement que le glutamate, est déjà réduite dans les données présentées plus haut à 3 T. La résonance C4 de la glutamine (31,3 ppm) est en effet située à peu près à mi-chemin entre le glutamate C4 (34,4 ppm) et le glutamate C3 (27,7 ppm). Elle n'est donc quasiment pas éditée par le module ZDQ de la méthode SPOCE, alors que le module SQ édite la glutamine C4 avec la même efficacité que le glutamate. Seule environ la moitié de la glutamine C4 est donc éditée. Par conséquent, la contamination du glutamate C4 par la glutamine C4 est divisée par deux par rapport à la séquence POCE. En revanche, la glutamine C3 est presque totalement co-éditée avec le glutamate C3 car les résonances ^{13}C des deux carbones sont très proches (27,0 et 27,7 ppm).

Les délais $1/2J$ et τ de la séquence SPOCE sont optimisés pour séparer deux résonances particulières, par exemple le glutamate C3 et C4 ou bien le glutamate C4 et la glutamine C4. La mesure simultanée des cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 et de la glutamine C3 et C4 n'apparaît donc pas possible avec la méthode SPOCE. Les systèmes à très haut champ [Pfeuffer-1999a] ou des approches par spectroscopie 2D [Watanabe-2000a] peuvent apporter des solutions à ce problème important. Néanmoins, la spectroscopie ^{13}C directe, malgré sa faible sensibilité, reste une alternative attractive pour étudier le marquage des

métabolites qui possèdent une vitesse de synthèse beaucoup plus faible que celle du glutamate.

Une autre source possible de contamination dans la région 2,0-2,5 ppm des spectres édités par SPOCE est la résonance du groupe méthyl du NAA à 2,0 ppm. Le NAA se marque extrêmement lentement à partir du glucose dans le cerveau [Choi-2000], mais il est détectable même en abondance naturelle à cause de sa forte concentration. Le déplacement chimique ^{13}C du CH_3 du NAA (22,9 ppm) est tel que les satellites correspondant sont co-édités majoritairement avec le glutamate C4. Lorsque la résolution spectrale est suffisante, un épaulement est visible sur le spectre édité du glutamate C4 à 2,0 ppm. Cette contamination reste cependant faible.

I.2.7. Conclusion

En conclusion, la méthode SPOCE devrait remplacer avantageusement la méthode POCE classique pour toutes les études de marquage du glutamate C3 et C4, particulièrement aux champs inférieurs à 4 T. En mesurant séparément les résonances C3 et C4, l'information cinétique obtenue est plus précise et l'analyse des spectres est simplifiée. Cela devrait faciliter les mesures de vitesse du cycle de Krebs aux champs magnétiques intermédiaires couramment utilisés chez l'homme.

I.3. Edition du GABA sans contamination par les macromolécules

I.3.1. Introduction : mesure du GABA par spectroscopie RMN

L'acide γ -amino butyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau des mammifères. Il est impliqué dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques, parmi lesquelles l'épilepsie, la maladie de Huntington, la dépression, l'alcoolisme et la schizophrénie. En particulier, la maladie de Huntington se traduit par une dégénérescence sélective des neurones GABAergiques dans le striatum. La détection du GABA de manière non-invasive chez l'homme et chez l'animal présente donc un intérêt majeur pour l'étude de la physiopathologie de ces maladies et l'évaluation de nouveaux traitements neuroprotecteurs.

La détection et la quantification du GABA par SRM est rendue difficile par la faible résolution spectrale de la spectroscopie proton. En effet, les résonances du GABA, dont la concentration dans le cerveau est de l'ordre de 1 mM, sont recouvertes par celles d'autres métabolites plus concentrés. Plus précisément, le spectre RMN proton de la molécule de GABA ($\text{HOOC-C}_{(2)}\text{H}_2\text{-C}_{(3)}\text{H}_2\text{-C}_{(4)}\text{H}_2\text{-NH}_2$) comprend trois résonances à 3,0 ppm, 2,3 ppm et 1,9 ppm qui correspondent respectivement aux protons des groupements $\text{C}_{(4)}\text{H}_2$, $\text{C}_{(2)}\text{H}_2$, et $\text{C}_{(3)}\text{H}_2$ (Figure 36). Les couplages scalaires (couplage J) entre les protons subdivisent ces résonances en deux triplets à 3,0 et 2,3 ppm et un quintuplet à 1,9 ppm. Le spectre proton du cerveau est dominé par les résonances des autres métabolites plus concentrés, en particulier la choline (3,2 ppm), la créatine (3,0 ppm), le glutamate et la glutamine (entre 2,1 et 2,4 ppm) et le NAA (2,0 ppm). La comparaison du spectre GABA et du spectre du cerveau obtenus par simulation (Figure 36) montre que la résonance du GABA à 3,0 ppm est masquée par le singulet de la créatine, la résonance à 2,3 ppm par les multiplets du glutamate et de la glutamine, et la résonance à 1,9 ppm par le NAA à 2,0 ppm. Les résonances du GABA à 2,3 ppm et 1,9 ppm sont les plus difficiles à observer *in vivo*, à cause des effets de couplage fort entre ces deux résonances ($\Delta\nu=0,4$ ppm soit 50 Hz à 3 T, alors que $J_{\text{HH}}=7$ Hz) et parce que les

propriétés de couplage du glutamate sont proches de celles du GABA, ce qui rend ces deux métabolites difficiles à éditer séparément. De plus, la résonance du GABA à 1,9 ppm est un quintuplet : la dispersion spectrale du signal due au couplage J diminue le rapport signal-sur-bruit de cette résonance. Par conséquent, la résonance du GABA à 3,0 ppm constitue la cible principale des méthodes de détection du GABA. A cette fréquence, le GABA est superposé à un singulet de créatine environ 10 fois plus intense.

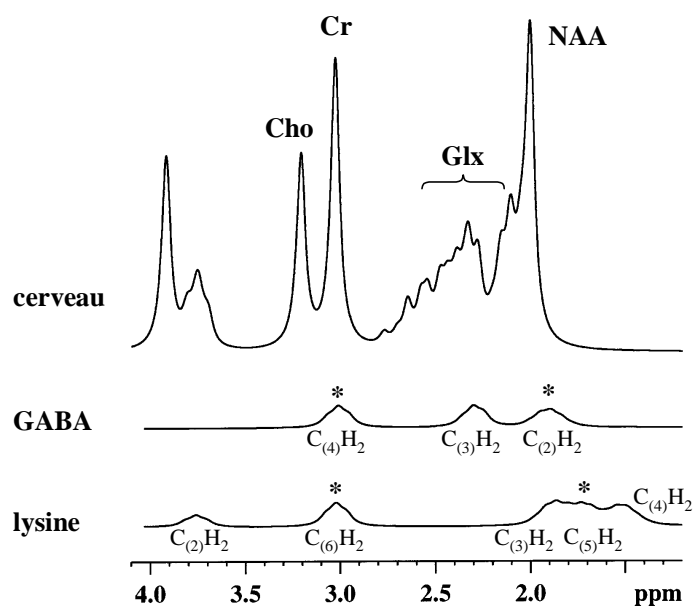


Figure 36. Spectres proton du GABA (spectre du milieu), de la lysine (spectre du bas) et d'un mélange des métabolites les plus concentrés dans le cerveau (créatine, choline, glutamate, glutamine et NAA). Les simulations ont été réalisées avec le logiciel Bruker NMRSIM[®] et l'échelle relative des spectres correspond approximativement aux concentrations des métabolites in vivo. En particulier, la résonance du GABA à 3,0 ppm est recouverte par un pic intense de créatine et par une des résonances de la lysine. Les étoiles indiquent que la résonance du GABA à 3,0 ppm est couplée à une résonance à 1,9 ppm et la résonance de la lysine à 3,0 ppm est couplée à une résonance à 1,7 ppm.

Un deuxième pic, provenant des macromolécules, est également présent à 3,0 ppm, d'intensité comparable à celle du GABA. Le terme générique de macromolécules regroupe les nombreuses résonances provenant des acides aminés constituant les protéines [Behar-1993; Behar-1994]. Parmi celles-ci, la résonance à 3,0 ppm a été attribuée au groupement $C_{(6)}H_2$ de la lysine ($NH_2-C_{(6)}H_2-C_{(5)}H_2-C_{(4)}H_2-C_{(3)}H_2-C_{(2)}H_2-NH_2-COOH$). Elle est couplée à la résonance $C_{(5)}H_2$ à 1,7 ppm ($J_{HH}=7$ Hz) (Figure 36). Les valeurs de déplacement chimique et de couplage J des groupements $C_{(6)}H_2$ et $C_{(5)}H_2$ de la lysine sont donc très proches de celles des groupements $C_{(4)}H_2$ et $C_{(3)}H_2$ du GABA, car la partie terminale de la chaîne latérale de la lysine est identique à celle du GABA. Ceci complique la discrimination du GABA et des

macromolécules à 3,0 ppm. En effet, la plupart des techniques d'édition utilisent les propriétés de couplage pour simplifier le spectre proton et détecter sélectivement certaines résonances.

Une technique efficace de détection du GABA à 3,0 ppm doit éliminer à la fois la contamination par le singulet du CH_3 de la créatine et la contamination par le CH_2 la lysine. De nombreuses approches ont été proposées pour y parvenir. Parmi celles-ci, la technique d'édition par différence mise au point par l'équipe de l'université de Yale occupe une place particulière. En effet, la quasi-totalité des applications pharmacologiques et physiopathologiques de mesure du GABA *in vivo* chez l'animal et chez l'homme a été réalisée avec cette technique et par cette équipe. En outre, seule cette technique permet de corriger la contamination par les macromolécules. Cette correction exige d'acquérir séparément un signal de GABA (contaminé par les macromolécules) et un signal de macromolécules (contaminé par le GABA), ce qui double la durée d'acquisition.

Après une revue des techniques existantes, ce chapitre présente une nouvelle méthode d'édition qui permet de mesurer le signal de GABA directement par différence sans contamination par les macromolécules. Il ne s'agit pas d'une nouvelle séquence, mais plutôt d'une mise en œuvre différente de la technique d'édition par différence mise au point à Yale. Cette méthode nécessite l'emploi d'une impulsion sélective en fréquence qui possède des caractéristiques spectrales bien définies. Une telle impulsion a été synthétisée en utilisant l'algorithme de Shinnar-Le Roux.

I.3.2. Revue des techniques existantes

I.3.2.1. Edition du GABA par spectroscopie différentielle

Principe

Le principe de la technique d'édition homonucléaire par différence est d'éditer le GABA en soustrayant deux spectres obtenus avec deux séquences d'écho de spin notées A et B (Figure 37). Dans la séquence A, l'impulsion de refocalisation agit sur le $\text{C}_{(4)}\text{H}_2$ à 3,0 ppm, mais n'a pas d'effet sur le $\text{C}_{(3)}\text{H}_2$ à 1,9 ppm. Dans la séquence B, l'impulsion de refocalisation agit à la fois à 3,0 ppm et 1,9 ppm.

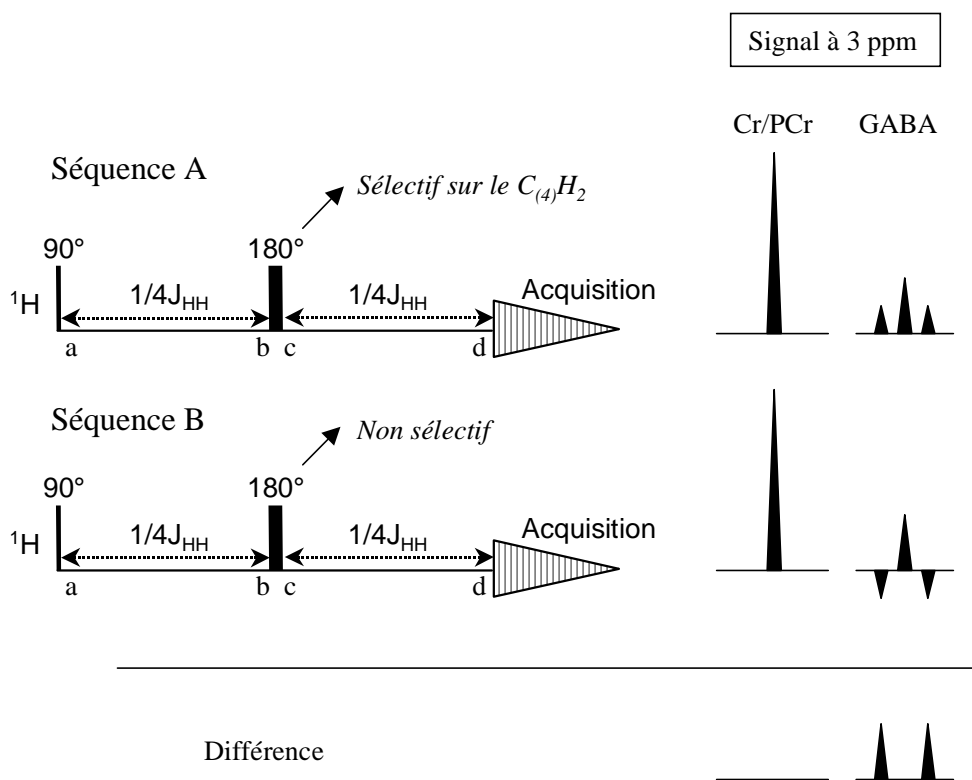


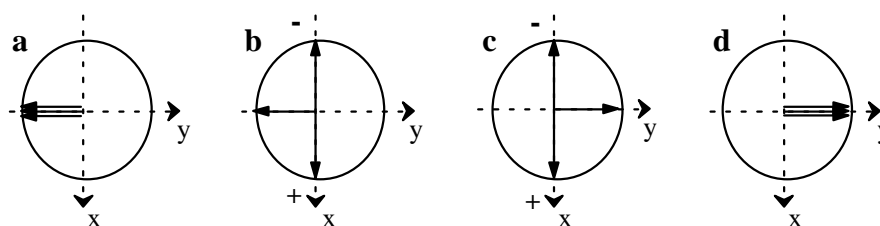
Figure 37. Schéma de principe de l'édition du GABA par différence. Dans la séquence A, l'impulsion de refocalisation de l'écho de spin est sélective sur le $C_{(4)}H_2$. Le signal de GABA obtenu est un triplet en phase. Dans la séquence B, l'impulsion 180° est non sélective. Le signal de GABA obtenu est un triplet antiphase. La soustraction des deux signaux aboutit à un pseudo-doublet. La créatine se comporte de manière identique dans les deux séquences et disparaît dans la différence.

Lorsque l'impulsion de refocalisation est sélective sur le $C_{(4)}H_2$, la J-modulation du triplet du GABA à 3,0 ppm est annulée et le triplet apparaît en phase quelle que soit la valeur du temps d'écho. En revanche, lorsque l'impulsion de refocalisation est non sélective, le triplet subit l'effet de la J-modulation pendant le temps d'écho. Si le temps d'écho total est choisi égal à $1/2J_{HH}$, le triplet obtenu est un triplet antiphase dont la raie centrale n'est pas inversée alors que les deux raies latérales sont inversées (Figure 37). La différence du triplet en phase et du triplet antiphase aboutit à un pseudo-doublet. Le singulet de la créatine à 3,0 ppm ne subit pas la J-modulation et est refocalisé de manière identique dans les deux séquences A et B. Il est donc éliminé dans la différence. A cause de la soustraction de la raie centrale du triplet du GABA, le rendement de la technique d'édition par différence est de seulement 50%.

Le résultat des séquences A et B peut être analysé en utilisant le formalisme vectoriel (Figure 38). Le triplet est représenté par trois aimantations correspondant à chacune

des trois raies, et la raie centrale est supposée à la résonance. Les deux raies latérales ont une fréquence de $-J/2$ et $+J/2$ dans le référentiel tournant. Pendant la séquence A, l'impulsion d'excitation bascule l'aimantation dans le plan transverse. Les deux aimantations correspondant aux raies latérales effectuent chacune un quart de tour pendant le premier délai $1/4J$. L'impulsion de refocalisation sélective sur le $C_{(4)}H_2$ inverse l'aimantation de la raie centrale et est sans effet sur les aimantations des deux raies latérales. Ces dernières tournent à nouveau d'un quart de tour et se trouvent en phase avec la raie centrale au début de l'acquisition. Pendant la séquence B, l'évolution est la même, mais l'impulsion 180° est cette fois non sélective et inverse non seulement l'aimantation de la raie centrale, mais également les populations des spins résonnant à 1,9 ppm. Ceci a pour effet d'invertir les deux aimantations correspondant aux raies centrales. Celles-ci se refocalisent alors en opposition de phase avec la raie centrale du triplet pendant le second délai $1/4J$.

Séquence A (180° sélectif sur le $C_{(4)}H_2$)



Séquence B (180° non sélectif)

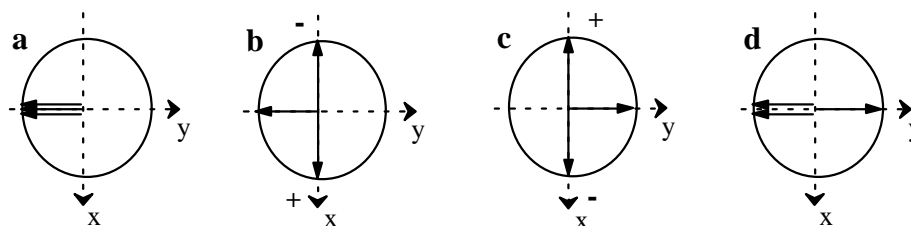


Figure 38. Analyse de la séquence d'édition du GABA avec le formalisme vectoriel. Les temps notés a, b, c, d sont indiqués sur la Figure 37. Les trois flèches représentent respectivement l'aimantation de la raie centrale du triplet du GABA, fixe dans le référentiel tournant, et les aimantations de chacune des deux raies latérales notées + et -. Dans la séquence B, l'inversion 180° non sélective inverse les sens de rotation des aimantations correspondant aux raies latérales, qui se refocalisent en opposition de phase par rapport à l'aimantation de la raie centrale.

Remarque : la première séquence d'édition par différence fondée sur ce principe, proposée par Rothman *et al.*, utilise un découplage homonucléaire continu à la place de l'impulsion de refocalisation sélective à 3,0 ppm de la séquence A. Ce découplage est

appliqué une fois sur deux à 1,9 ppm [Rothman-1984]. L'effet résultant est le même car le découplage continu à 1,9 ppm supprime la J-modulation du triplet à 3,0 ppm.

Analyse avec le formalisme des opérateurs-produits

La séquence peut également être analysée en utilisant le formalisme des opérateurs-produits. Les deux protons du groupement $C_{(4)}H_2$ du GABA sont équivalents et le calcul peut être mené sur un seul proton. Ce proton est couplé aux deux protons du groupement $C_{(3)}H_2$ à 1,9 ppm. Le système de spins étudié est donc un système à trois spins de type AX_2 . Dans la suite, le spin I représente un des deux protons à 3,0 ppm, alors que S_1 et S_2 représentent chacun des deux protons à 1,9 ppm. Les effets de déplacement chimique sont refocalisés par l'écho de spin et ne sont pas pris en compte dans le calcul. La phase de toutes les impulsions est supposée selon l'axe x.

Avant d'effectuer le calcul complet, calculons l'évolution d'une aimantation transversale I_x et I_y sous l'effet du couplage J pendant un délai τ . L'effet du couplage entre le spin et les spins S_1 et S_2 peut être calculé successivement car les opérateurs $I_z S_{1z}$ et $I_z S_{2z}$ commutent :

$$\begin{aligned} I_x &\xrightarrow{2\pi J\tau I_z S_{1z}} I_x \cos(\pi J\tau) + 2I_y S_{1z} \sin(\pi J\tau) \\ &\xrightarrow{2\pi J\tau I_z S_{2z}} I_x \cos^2(\pi J\tau) + 2I_y S_{2z} \sin(\pi J\tau) \cos(\pi J\tau) \\ &\quad + 2I_y S_{1z} \sin(\pi J\tau) \cos(\pi J\tau) - 4I_x S_{1z} S_{2z} \sin^2(\pi J\tau) \end{aligned}$$

En notant : $c = \cos(\pi J\tau)$ et $s = \sin(\pi J\tau)$, on a :

$$I_x \xrightarrow{2\pi J\tau I_z S_{1z}} \xrightarrow{2\pi J\tau I_z S_{2z}} I_x \cdot c^2 + 2I_y S_{2z} \cdot sc + 2I_y S_{1z} \cdot sc - 4I_x S_{1z} S_{2z} \cdot s^2$$

De même :

$$I_y \xrightarrow{2\pi J\tau I_z S_{1z}} \xrightarrow{2\pi J\tau I_z S_{2z}} I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2$$

Calculons maintenant l'évolution pendant la séquence d'écho de spin :

Premier cas : impulsion de refocalisation sélective sur le $C_{(4)}H_2$ (i. e. sur I).

L'aimantation est basculée dans le plan transversal :

$$\sigma(0)^+ = -I_y$$

puis évolue pendant le premier délai τ :

$$\sigma(\tau)^- = -I_y \cdot c^2 + 2I_x S_{2z} \cdot sc + 2I_x S_{1z} \cdot sc + 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2$$

L'impulsion 180°_x sélective sur I conduit à :

$$\sigma(\tau)^+ = I_y \cdot c^2 + 2I_x S_{2z} \cdot sc + 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2$$

Les aimantations I_x et I_y évoluent de nouveau pendant le deuxième délai τ sous l'effet du couplage avec S_1 et S_2 :

$$\begin{aligned} \sigma(2\tau) = & \left(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2 \right) \cdot c^2 \\ & + 2 \left(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2 \right) \cdot S_{2z} \cdot cs \\ & + 2 \left(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2 \right) \cdot S_{1z} \cdot cs \\ & - 4 \left(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2 \right) \cdot S_{1z} S_{2z} \cdot s^2 \end{aligned}$$

Après regroupement, on obtient :

$$\begin{aligned} \sigma(2\tau) = & I_y \cdot (c^4 + c^2 s^2 + c^2 s^2 + s^4) + 2I_x S_{1z} \cdot (-c^3 s - s^3 c + c^3 s + s^3 c) \\ & + 2I_x S_{2z} \cdot (-c^3 s + c^3 s - s^3 c + s^3 c) + 42I_y S_{1z} S_{2z} \cdot (-s^2 c^2 + s^2 c^2 + s^2 c^2 - s^2 c^2) \\ \sigma(2\tau) = & I_y \cdot (c^4 + c^2 s^2 + c^2 s^2 + s^4) = I_y \cdot (c^2 + s^2)^2 \end{aligned}$$

Comme $c^2 + s^2 = 1$, on obtient finalement :

$$\boxed{\sigma(2\tau) = I_y}$$

Lorsque l'impulsion de refocalisation est sélective sur le $C_{(4)}H_2$, tout se passe donc comme si le couplage J n'avait aucun effet. Le signal obtenu est un triplet en phase.

Deuxième cas : impulsion de refocalisation non sélective.

L'évolution jusqu'à l'impulsion 180° est identique à précédemment :

$$\sigma(\tau)^- = -I_y \cdot c^2 + 2I_x S_{2z} \cdot sc + 2I_x S_{1z} \cdot sc + 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2$$

L'impulsion 180°_x non sélective conduit à :

$$\sigma(\tau)^+ = I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2$$

Les aimantations I_x et I_y évoluent pendant le deuxième délai τ sous l'effet du couplage avec S_1 et S_2 :

$$\begin{aligned} \sigma(2\tau) = & (I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2) \cdot c^2 \\ & - 2(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2) \cdot S_{2z} \cdot cs \\ & - 2(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2) \cdot S_{1z} \cdot cs \\ & - 4(I_y \cdot c^2 - 2I_x S_{2z} \cdot sc - 2I_x S_{1z} \cdot sc - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot s^2) \cdot S_{1z} S_{2z} \cdot s^2 \end{aligned}$$

Après regroupement, on obtient :

$$\begin{aligned} \sigma(2\tau) = & I_y \cdot (c^4 - c^2 s^2 - c^2 s^2 + s^4) + 2I_x S_{1z} \cdot (-c^3 s + s^3 c - c^3 s + s^3 c) \\ & + 2I_x S_{2z} \cdot (-c^3 s - c^3 s + s^3 c + s^3 c) + 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot (-s^2 c^2 - s^2 c^2 - s^2 c^2 - s^2 c^2) \\ \sigma(2\tau) = & I_y \cdot (c^2 - s^2)^2 + 2I_x S_{1z} \cdot (2s^3 c - 2c^3 s) + 2I_x S_{2z} \cdot (2s^3 c - c^3 s) - 4I_y S_{1z} S_{2z} \cdot (4s^2 c^2) \end{aligned}$$

Lorsque l'impulsion de refocalisation est non sélective sur le $C_{(4)}H_2$, l'aimantation au début de l'acquisition comprend 4 termes. Le terme I_y correspond à un triplet en phase, les termes de la forme $I_x S_z$ correspondent à un doublet antiphase et le terme $-4I_y S_{1z} S_{2z}$ correspond à un triplet antiphase.

Dans le cas particulier où $\tau=1/4J$, on a : $s = c = \frac{\sqrt{2}}{2}$, ce qui entraîne :

$$\boxed{\sigma(2\tau) = -4I_y S_{1z} S_{2z}}$$

On obtient alors bien un triplet antiphase.

Réalisation des impulsions de refocalisation sélective et non-sélective

Plusieurs possibilités ont été proposées pour réaliser les impulsions de refocalisation sélective et non-sélective dans les séquences A et B. Deux contraintes doivent être respectées. Premièrement, l'effet de la séquence A et de la séquence B doit être strictement identique à 3,0 ppm afin que la créatine soit parfaitement soustraite. Ceci impose que les séquences A et B diffèrent le moins possible l'une de l'autre. Deuxièmement, le temps d'écho total de la séquence est fixé à $1/2J_{\text{HH}}$, limitant ainsi la durée des impulsions qui peuvent être intégrées dans l'écho de spin.

Dans la méthode proposée par Rothman *et al.* et représentée sur la Figure 39, la refocalisation sélective à 3,0 ppm de la séquence A est réalisée avec une impulsion semisélective 2-2 possédant un zéro de refocalisation à 1,9 ppm et un zéro sur l'eau [Hore-1983; Rothman-1993]. La refocalisation non-sélective de la séquence B est obtenue en ajoutant à l'impulsion semisélective une impulsion 180° très sélective en fréquence appliquée à 1,9 ppm. La combinaison de l'impulsion semisélective 2-2 et de l'impulsion DANTE inverse les spins à la fois à 3,0 ppm et à 1,9 ppm. L'impulsion utilisée par Rothman *et al.* consiste en un train d'impulsions DANTE [Morris-1978].

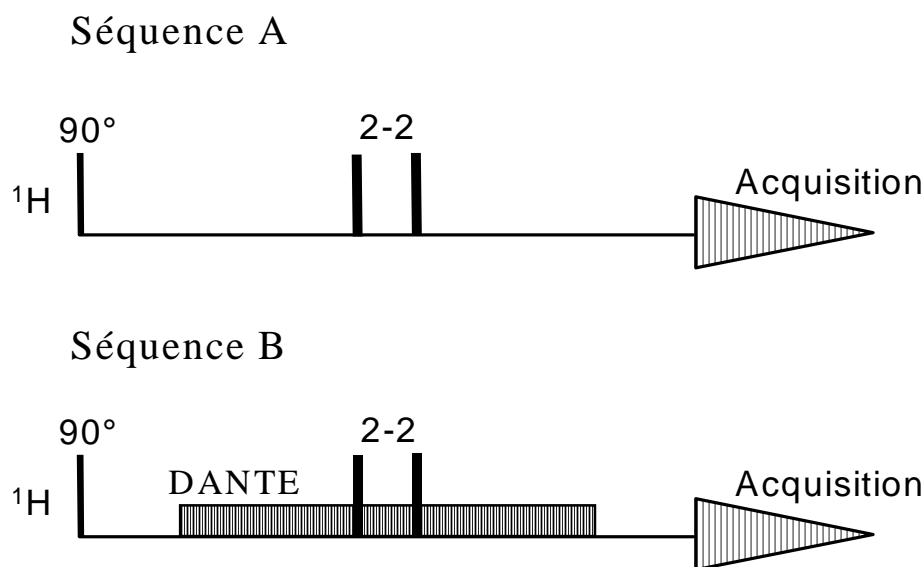


Figure 39. Séquence d'édition du GABA par différence proposée par Rothman *et al.* Dans la séquence A, l'impulsion de refocalisation sélective sur le C_4H_2 est réalisée par une impulsion semisélective 2-2 avec un zéro à 1,9 ppm et un zéro sur l'eau. Dans la séquence B, une impulsion DANTE est appliquée à 1,9 ppm de manière à refocaliser les spins à la fois à 3,0 ppm et à 1,9 ppm.

Exactement sur le même principe, Hetherington *et al.* ont proposé d'utiliser à la place de l'impulsion DANTE une impulsion sélective optimisée numériquement pour améliorer son profil fréquentiel [Hetherington-1998]. L'impulsion optimisée a été définie par une succession de 30 impulsions séparés par 29 délais avec une symétrie palindromique. La durée des impulsions et les délais ont été optimisés par moindres carrés pour que le profil de l'impulsion approche au mieux le profil fréquentiel rectangulaire idéal.

Keltner *et al.* ont proposé une approche légèrement différente représentée sur la Figure 40a [Keltner-1996]. L'impulsion de refocalisation non sélective de la séquence B est réalisée par une simple impulsion rectangulaire large bande. L'impulsion de refocalisation sélective à 3,0 ppm est obtenue en ajoutant à l'impulsion large bande une impulsion rectangulaire sélective en fréquence. La durée de cette impulsion a été optimisée pour n'avoir aucun effet à 3,0 ppm. L'effet à 1,9 ppm résultant de l'action combinée de l'impulsion large bande (180°) et de l'impulsion sélective (-180°) est bien 0° . Par ailleurs, alors que les méthodes présentées précédemment ont été utilisées avec la méthode de localisation ISIS, Keltner *et al.* ont intégré le module d'édition du GABA dans une localisation PRESS. Weber *et al.* ont également proposé d'éditer le GABA avec une séquence PRESS en introduisant une impulsion de refocalisation semisélective 2-2 une acquisition sur deux [Weber-1999].

Enfin, Mescher *et al.* ont proposé l'édition du GABA avec la technique MEGA selon le schéma de la Figure 40b [Mescher-1998]. Le principe de la séquence MEGA est d'intégrer dans l'écho de spin une impulsion 180°_s sélective en fréquence, entourée par des gradients *asymétriques*. Cette impulsion 180°_s a pour effet de déphaser sélectivement le signal à la fréquence à laquelle elle est appliquée. Elle est appliquée deux fois de part et d'autre de l'impulsion 180° pour respecter la symétrie de l'écho de spin. Pour l'édition du GABA, Mescher *et al.* ont utilisé une impulsion 180°_s double bande. Dans la séquence A (refocalisation sélective à 3,0 ppm), les deux bandes ont été appliquées à 1,9 ppm et sur l'eau à 4,7 ppm. Dans la séquence B (refocalisation non sélective), les deux bandes ont été appliquées à 4,7 ppm et à 7,5 ppm (symétrique de 1,9 ppm par rapport à 4,7 ppm). Cette technique permet d'effectuer simultanément la suppression du pic de l'eau et l'édition du GABA.

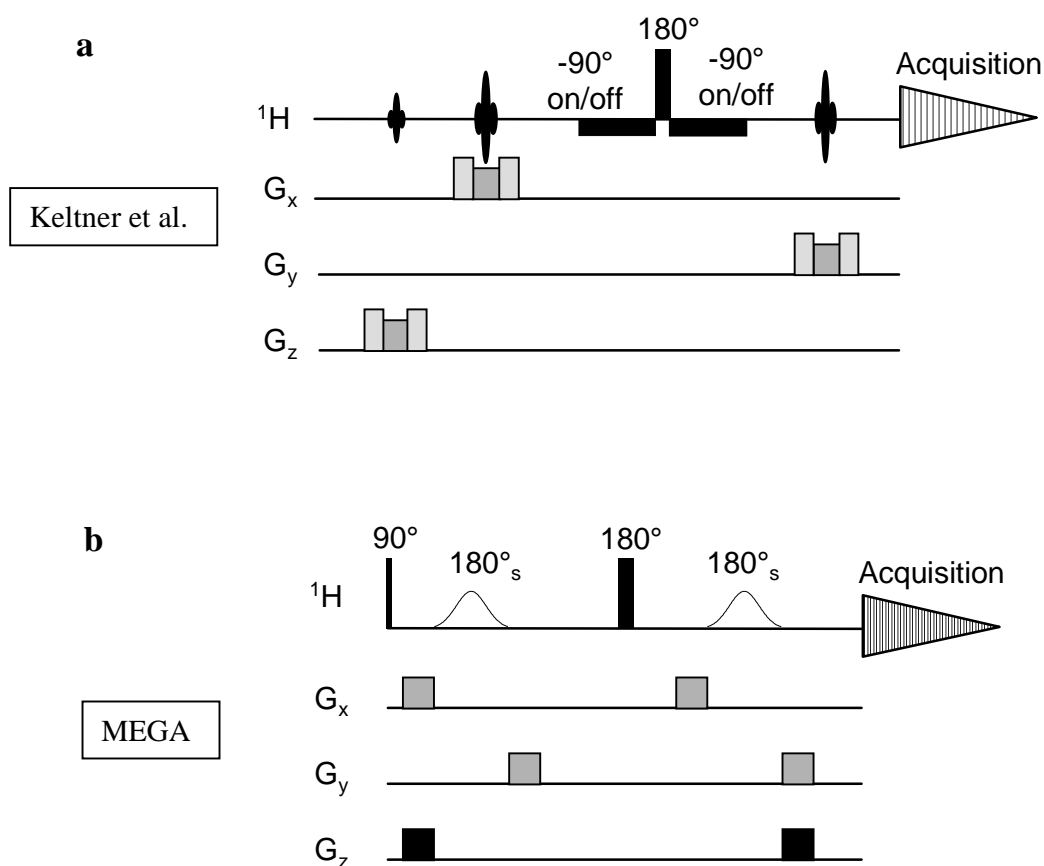


Figure 40. Autres approches proposées pour réaliser l'impulsion de refocalisation sélective sur le $C_{(4)}H_2$ et l'impulsion non sélective. (a) Dans l'approche proposée par Keltner et al., l'impulsion de refocalisation non sélective est réalisée par une impulsion large-bande bp. La refocalisation sélective est obtenue en ajoutant une impulsion sélective à 1,9 ppm. (b) Schéma de la séquence MEGA dans laquelle la bande spectrale autour de 1,9 ppm est déphasée une acquisition sur deux par des impulsions 180° sélectives entourées de gradients asymétriques.

En résumé, la plupart des techniques d'édition par différence utilisent une impulsion de refocalisation très sélective en fréquence appliquée une fois sur deux à 1,9 ppm. Dans la suite, cette impulsion sélective sera appelée *impulsion sélective d'édition*. Le choix de cette impulsion est critique pour l'efficacité de la technique d'édition du GABA, car la créatine ne se soustrait correctement que si les séquences avec et sans l'impulsion d'édition ont un effet identique autour de 3,0 ppm. En particulier, l'impulsion d'édition ne doit pas introduire de distorsion d'intensité ou de distorsion de phase à 3,0 ppm. Si l'on suppose par exemple une concentration de créatine de 8 mM et une concentration de GABA de 0,8 mM, un résiduel d'intensité de 1% de la créatine suffit à provoquer une erreur de 10% sur le GABA. De même, un déphasage même faible de la créatine entraîne un résiduel dispersif dans la différence qui distord fortement le signal de GABA. Ces effets de déphasage peuvent néanmoins être

supprimés (ou plutôt convertis en perte d'intensité) par un cyclage de phase approprié qui élimine l'aimantation dispersive refocalisée par un écho de spin [Hetherington-1985].

Correction de la contamination par les macromolécules : approche « Yale »

La sélectivité en fréquence de l'impulsion d'édition est également primordiale dans les méthodes d'édition par différence pour limiter la contamination par les macromolécules. En effet, l'impulsion d'édition appliquée à 1,9 ppm a pour but d'inverser sélectivement le triplet $C_{(3)}H_2$ du GABA à 1,9 ppm et n'a idéalement aucun effet sur le reste du spectre. En pratique, cette contrainte est bien sûr impossible à réaliser et l'impulsion possède une bande d'inversion spectrale de largeur à mi-hauteur Δf non-nulle. L'effet non-nul de l'impulsion d'édition à 1,7 ppm entraîne la coédition partielle des macromolécules avec le GABA. La largeur de bande Δf peut être diminuée en augmentant la durée de l'impulsion. Cependant, cette dernière est limitée par le temps d'écho total de la séquence fixé à $1/2J_{HH}$, soit environ 70 ms. Le temps effectivement disponible pour insérer l'impulsion d'édition dans la séquence d'écho de spin est obtenu en retranchant de ces 70 ms le temps nécessaire à l'application des autres impulsions RF et des impulsions de gradients.

Comme la dispersion spectrale augmente avec le champ magnétique B_0 , la contamination du GABA par les macromolécules est d'autant plus faible que le champ est élevé. A 7 T, l'écart de 0,2 ppm entre le GABA et la lysine correspond à 60 Hz, et il est facile de réaliser une impulsion suffisamment sélective pour inverser le GABA à 1,9 ppm sans affecter les macromolécules à 1,7 ppm. En revanche, à 3 T où 0,2 ppm équivalent à 25 Hz, il n'est pas possible de réaliser une impulsion suffisamment sélective et la contamination du GABA par les macromolécules ne peut pas être évitée par l'approche décrite précédemment. Lorsque l'impulsion d'édition est appliquée à 1,9 ppm (Figure 41a), le signal G^* obtenu correspond alors au signal de GABA contaminé par le signal des macromolécules :

$$G^* = e.G + s.M$$

où e est l'efficacité d'édition à la résonance et s l'efficacité d'édition à 0,2 ppm de la résonance. Les valeurs de e et s sont exprimées par rapport à l'efficacité théorique maximale de l'édition par différence qui vaut 50%. La valeur de e est en général proche de 100%. La valeur de s dépend de l'impulsion d'édition utilisée et du champ B_0 . A 3 T, il est difficile d'obtenir une valeur de s inférieure à 40%.

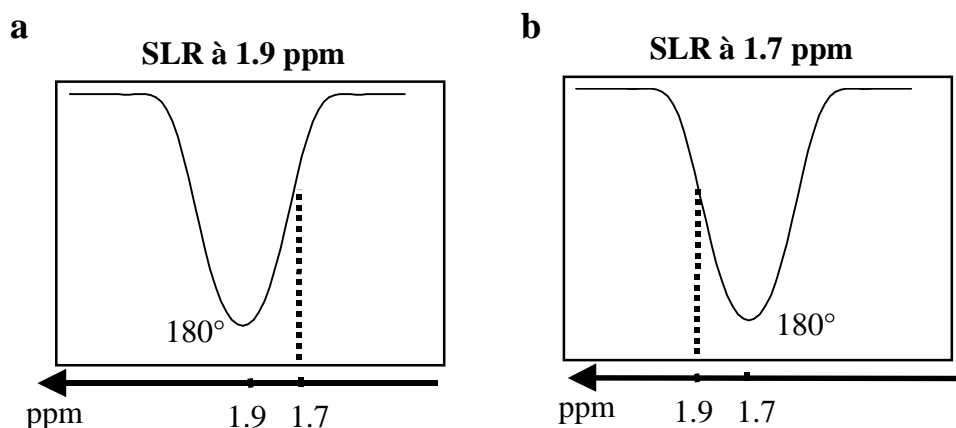


Figure 41. Schéma de principe de la correction de la contamination du GABA par les macromolécules par l'approche « Yale ». (a) Dans une première expérience, l'impulsion d'édition sélective est appliquée sur le $C_{(3)}H_2$ du GABA à 1,9 ppm. A cause de l'effet non-nul de l'impulsion à 1,7 ppm, le signal de GABA obtenu est contaminé par les macromolécules. (b) Dans une première expérience, l'impulsion d'édition sélective est appliquée sur le $C_{(5)}H_2$ de la lysine. Le signal de macromolécules obtenu est contaminé par le GABA. La déconvolution de ces deux signaux permet de calculer la concentration de GABA et de macromolécules.

La contamination peut être corrigée en répétant l'expérience de façon symétrique sur les macromolécules, c'est-à-dire en appliquant l'impulsion d'édition à 1,7 ppm (Figure 41b). Le signal de macromolécules édité est alors contaminé par le GABA :

$$M^* = e' \cdot M + s' \cdot G$$

En faisant l'hypothèse que l'effet de l'impulsion sélective est symétrique lorsque cette impulsion est appliquée à 1,9 ppm ou à 1,7 ppm, on a $e = e'$ et $s = s'$. Les valeurs e et s peuvent être calibrées précisément *in vitro*. De la connaissance de G^* et M^* , on déduit alors facilement G et M :

$$G = 1/\Delta^* (e \cdot G^* - s \cdot M^*)$$

$$M = 1/\Delta^* (e \cdot M^* - s \cdot G^*)$$

$$\text{avec } \Delta = e^2 - s^2$$

Ainsi la contamination du GABA par les macromolécules peut être corrigée, au prix d'un doublement de la durée de l'expérience pour la mesure du signal M^* . La mesure de la concentration de GABA corrigée de la contamination nécessite donc un total de quatre acquisitions, deux pour G^* et deux pour M^* , comme le montre la Figure 42. La séquence A, constituée d'un écho de spin avec une impulsion de refocalisation semisélective et aucune

impulsion d'édition, semble identique dans les deux expériences de mesure de G^* et M^* , offrant théoriquement la possibilité de réduire de quatre à trois le nombre d'acquisitions nécessaires. En réalité, ceci n'est pas tout à fait vrai car le zéro de l'impulsion de refocalisation semisélective doit en principe être placé à 1,9 ppm pour la mesure de G^* et à 1,7 ppm pour la mesure de M^* . La question de la position du zéro de l'impulsion 2-2 est examinée en détail plus loin.

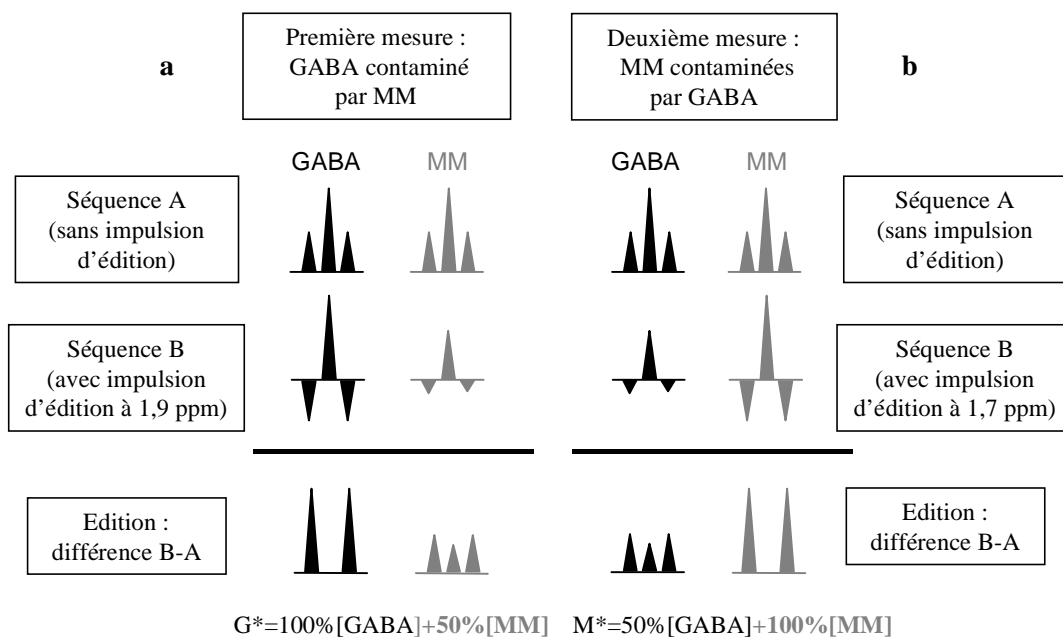


Figure 42. Effet de la méthode d'édition du GABA par différence (approche « Yale ») sur les triplets du GABA et de la lysine. (a) Dans la première mesure, le triplet de GABA est totalement inversé par l'impulsion sélective d'édition et le triplet de la lysine est partiellement inversé. Le doublet de GABA obtenu par différence est contaminé par la lysine. (b) Dans la deuxième mesure, de façon symétrique, le triplet de la lysine est totalement inversé par l'impulsion sélective d'édition et le triplet du GABA est partiellement inversé. Le doublet de lysine obtenu par différence est contaminé par le GABA. On a supposé que $e=100\%$ et $s=50\%$.

I.3.2.2. Autres approches d'édition du GABA

Bien que l'édition du GABA par différence développée à Yale, combinée avec une localisation ISIS, soit la seule technique ayant réellement débouché sur des applications *in vivo*, plusieurs autres méthodes ont été proposées pour mesurer le GABA.

Parmi les approches directes sans édition, il est possible d'estimer la concentration des différents métabolites, dont le GABA, en introduisant de la connaissance a priori dans l'analyse du spectre. La méthode LCMoDel, par exemple, approxime le spectre proton à temps

d'écho court par une combinaison linéaire des spectres individuels de chaque métabolite acquis *in vitro* [Provencher-1993; Pfeuffer-1999b]. Le problème de cette approche est l'erreur importante sur l'estimation du GABA (par exemple Provencher *et al.* mesurent une déviation standard de 67% sur la mesure du GABA à 1,5 T), et cette erreur ne devient acceptable qu'à très haut champ (12% à 9,4 T). Une seconde solution consiste à tirer parti de la RMN 2D pour acquérir plus d'information que sur un spectre 1D. Le GABA est alors mesuré sur le pic de corrélation entre 1,9 ppm et 3,0 ppm. La méthode SUPERCOSY permet notamment d'obtenir des pics de corrélation en phase alors que ces derniers sont en antiphase dans la méthode COSY standard et s'annulent partiellement voire totalement lorsque la largeur de raie est importante. Récemment, cette technique de détection 2D a été combinée à une mesure du GABA extracellulaire par microdialyse afin d'étudier la compartimentation du GABA *in vivo* après administration de gabaculine chez le rat à 9,4 T [Piérard-1999]. Les méthodes 2D ont cependant l'inconvénient d'être peu sensibles et nécessitent des temps d'acquisition longs. Elles n'ont jamais permis de mesurer le GABA *in vivo* à champ intermédiaire (1,5T-4T).

D'autres techniques d'édition que l'édition par différence ont également été proposées. L'édition par sélection des cohérences à double quantum permet par exemple d'éliminer toutes les résonances non couplées (singulets) en une seule acquisition. Elle permet ainsi de supprimer très efficacement la résonance de créatine qui recouvre le GABA à 3,0 ppm [Wilman-1993 ; Keltner-1997]. Cependant, la technique d'édition à double quantum ne permet d'éditer que 25% du signal de GABA, contre 50% pour la technique d'édition par différence. Des améliorations de la séquence ont été proposées pour augmenter l'efficacité de l'édition de 25% à 39% [Wilman-1995]. L'édition à double quantum a permis de démontrer la faisabilité de l'imagerie de déplacement chimique (CSI) du GABA *in vivo* [Shen-1999b]. Le principal inconvénient de l'édition à double quantum reste cependant l'impossibilité de corriger la contamination par les macromolécules. La spectroscopie J-résolue, dérivée de la spectroscopie J en 2D, a également été suggérée pour mesurer le GABA [den Hollander-1997]. Récemment, il a été montré que la spectroscopie J-résolue "suréchantillonnée" permet de mesurer les métabolites, notamment le GABA, sur des spectres sans suppression du pic de l'eau [Hurd-1998]. En revanche la contamination par les macromolécules n'est pas éliminée.

I.3.3. Edition sans contamination par les macromolécules : principe, matériels et méthodes

I.3.3.1. Principe

Le principe de la méthode proposée ici est de soustraire deux spectres pour lesquels l'impulsion sélective a été appliquée à 1,9 ppm (premier spectre) et à 1,5 ppm (deuxième spectre) (Figure 43). Si l'impulsion sélective d'édition est symétrique, l'effet à 1,7 ppm est identique dans les deux cas, et le pic de macromolécules à 3,0 ppm subit une J-modulation identique. Par conséquent, les macromolécules disparaissent dans la différence (Figure 44). En revanche, le GABA est complètement inversé lorsque l'impulsion est appliquée à 1,9 ppm, et n'est pas inversé lorsque l'impulsion est appliquée à 1,5 ppm. Ceci impose toutefois que l'impulsion n'ait aucun effet à 1,9 ppm lorsqu'elle est appliquée à 1,5 ppm (réponse fréquentielle suffisamment étroite).

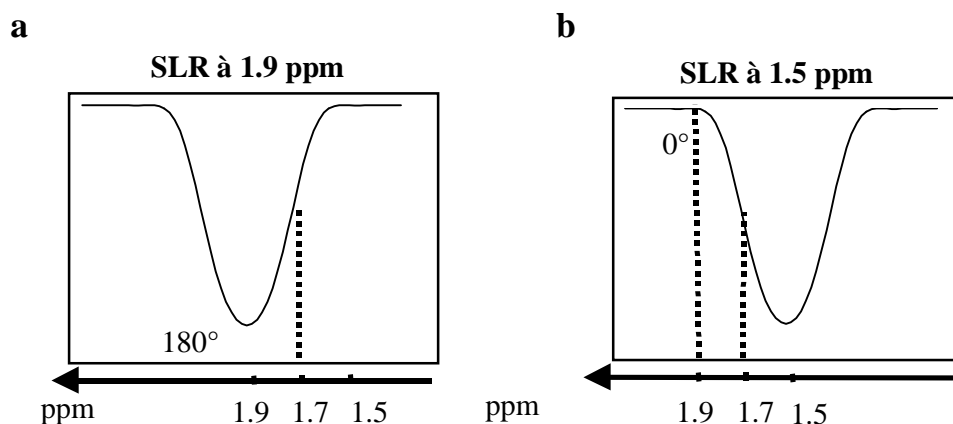


Figure 43. Principe de la nouvelle méthode d'édition directe du GABA sans contamination par les macromolécules. Le signal de GABA est obtenu par différence entre deux acquisitions avec (a) l'impulsion d'édition appliquée à 1,9 ppm et (b) l'impulsion d'édition appliquée à 1,5 ppm. L'effet de l'impulsion d'édition sur les macromolécules à 1,7 ppm est identique en (a) et (b) et la contamination par les macromolécules disparaît dans la différence. Le groupement $C_{(3)}H_2$ du GABA à 1,9 ppm subit bien 180° en (a) et 0° en (b), ce qui entraîne l'édition du GABA à 3,0 ppm.

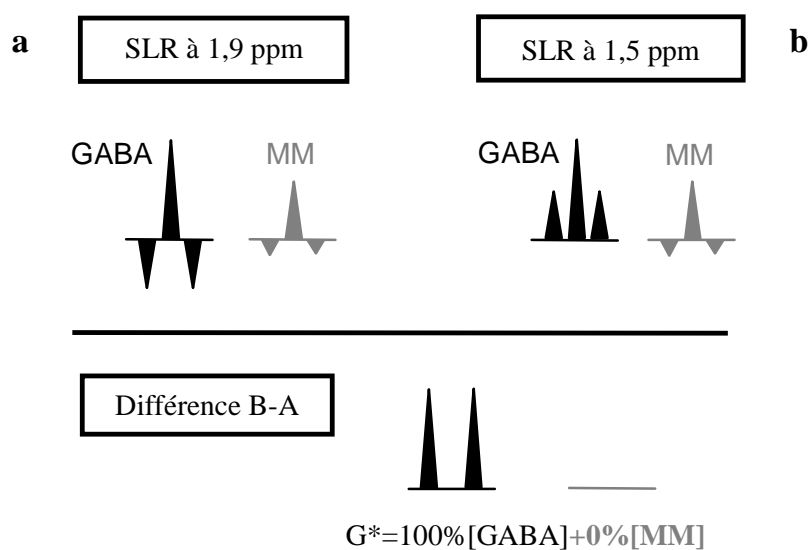


Figure 44. Effet de la nouvelle méthode d'édition du GABA sur les triplets du GABA et de la lysine à 3,0 ppm. (a) le triplet de GABA est totalement inversé par l'impulsion sélective d'édition et le triplet de la lysine est partiellement inversé (b) le triplet de GABA n'est pas inversé par l'impulsion sélective d'édition et le triplet de la lysine est partiellement inversé. Le signal de lysine disparaît de la différence et le doublet du GABA édité n'est pas contaminé.

I.3.3.2. Synthèse de l'impulsion sélective d'édition

Le profil d'inversion fréquentiel idéal de l'impulsion d'édition serait un profil rectangulaire autour de 1,9 ppm, assez large pour inverser correctement le GABA, et assez étroit pour ne perturber ni la résonance des macromolécules à 1,7 ppm, ni la résonance de la créatine à 3,0 ppm. Le choix de l'impulsion sélective d'édition doit permettre d'obtenir un profil d'inversion fréquentiel le plus proche possible de ce profil idéal. L'algorithme de Shinnar-Le Roux permet précisément de trouver la solution optimale compte tenu des contraintes imposées sur les caractéristiques temporelles et fréquentielles de l'impulsion. Nous avons donc décidé d'utiliser cet algorithme pour synthétiser l'impulsion d'édition du GABA.

L'algorithme de Shinnar-Le Roux (SLR)

L'algorithme de Shinnar-Le Roux établit une relation bijective (appelée *transformée SLR*) entre une impulsion modulée en amplitude définie par n segments d'amplitude constante et son profil fréquentiel défini par un polynôme de degré $(n-1)$ [Pauly-1991]. La synthèse d'une impulsion par l'algorithme de Shinnar-Le Roux se fait en deux étapes. Tout d'abord, le profil fréquentiel désiré doit être approximé par un polynôme d'ordre $(n-1)$. Ensuite,

l'impulsion est calculée à partir de ce polynôme par application de la transformée SLR inverse. Ainsi, la synthèse d'une impulsion possédant un profil fréquentiel donné se ramène à la synthèse d'un polynôme approximant au mieux le profil fréquentiel désiré.

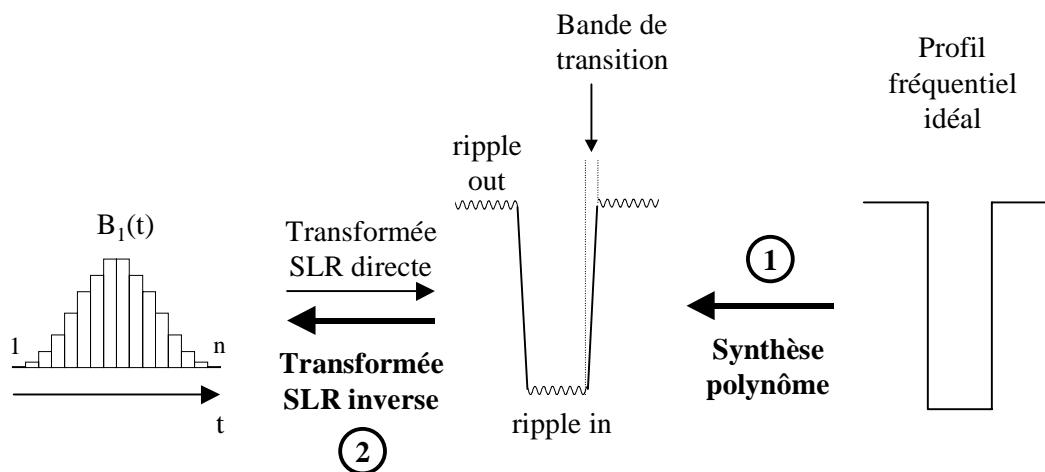


Figure 45. Principe de la synthèse d'une impulsion par l'algorithme de Shinnar-Le Roux (SLR). La transformée SLR établit une relation bijective entre la forme d'impulsion dans le domaine temporel (représentée par n éléments d'amplitude constante) et le profil fréquentiel de l'impulsion sous la forme d'un polynôme d'ordre $(n-1)$. La première étape de la synthèse d'une impulsion (1) consiste à synthétiser un polynôme approximant le profil fréquentiel désiré. La deuxième étape (2) consiste à appliquer la transformée SLR inverse pour obtenir $B_1(t)$.

Parmi les avantages de l'algorithme de Shinnar-Le Roux, notons qu'il s'agit d'une méthode non pas itérative, mais analytique. Cela implique que les caractéristiques de l'impulsion sont connues avant même que la synthèse soit effectuée. Les méthodes itératives ne possèdent pas cet avantage et les caractéristiques exactes de l'impulsion ne sont pas connues à l'avance. De plus, la solution trouvée n'est pas optimale si la synthèse converge vers un minimum local.

Synthèse du polynôme approximant la réponse fréquentielle

Cette approximation d'un profil par un polynôme est un problème classique du filtrage numérique en traitement du signal. L'algorithme de Parks-McClellan permet de trouver la solution optimale. Le polynôme est alors caractérisé par trois paramètres : l'oscillation dans la bande passante (ripple in), l'oscillation en dehors de la bande passante (ripple out), et la largeur de la bande de transition W . Ces trois paramètres sont reliés par une relation semi-empirique, si bien que seuls deux paramètres peuvent être fixés de manière indépendante, le

troisième étant alors déterminé. Par exemple, le ripple in et le ripple out peuvent être choisis par l'utilisateur, mais la bande de transition W est alors imposée. C'est la relation entre ces trois paramètres qui oblige à faire un compromis sur la qualité de l'approximation du profil idéal par le polynôme. La solution optimale obtenue par l'algorithme de Parks-McClellan assure que le meilleur compromis est trouvé entre ces trois paramètres.

Le polynôme peut également être déterminé par l'algorithme des moindres carrés (minimisation de la distance entre la réponse fréquentielle idéale et le polynôme). Dans ce cas, la solution n'est plus optimale, ce qui se traduit par une augmentation de la bande de transition pour des ripples in et out donnés. Néanmoins, en utilisant les moindres carrés, le ripple out diminue quand on s'éloigne de la bande passante (contrairement à la solution obtenue par l'algorithme de Parks-McClellan qui donne un ripple constant), ce qui se révèle avantageux dans le cas de l'édition du GABA.

Le programme MATPULSE

Le programme MATPULSE, écrit par G. B. Matson, est un logiciel disponible sur internet (www.mmrrcc.upenn.edu) qui permet de synthétiser des impulsions en utilisant l'algorithme de Shinnar-Le Roux [Matson-1994]. Il est écrit en langage MATLAB et possède une interface utilisateur conviviale. Il suffit de spécifier la longueur de l'impulsion, la bande passante et l'intensité maximale δ_1 et δ_2 des oscillations dans et hors de la bande passante (la largeur de la bande de transition est alors connue). Le programme synthétise l'impulsion SLR correspondant à ces paramètres.

Choix des caractéristiques de l'impulsion d'édition

Le temps d'écho total de la séquence étant fixé à $1/2J_{HH}$, soit 70 ms, et compte-tenu du temps nécessaire pour l'application des impulsions RF et des gradients de déphasage, la durée de l'impulsion sélective d'édition ne peut pas être supérieure à 43 ms dans nos conditions expérimentales. Les caractéristiques fréquentielles imposées à l'impulsion d'édition (180° à 1,9 ppm, effet minimal à 1,7 ppm, effet quasiment nul (0°) à 3,0 ppm) se transposent pour la synthèse de l'impulsion SLR en conditions draconiennes : δ_1 minimal, δ_2 minimal, W minimal. Comme il est impossible de minimiser en même temps ces trois paramètres, il s'agit de trouver un compromis acceptable. La valeur de δ_2 (ripple in) semble la moins critique:

quelques pourcents d'erreur peuvent être tolérés dans la bande d'inversion. En revanche, la valeur de δ_1 (ripple out) doit rester faible pour que l'impulsion appliquée à 1,9 ppm ne perturbe pas la créatine à 3,0 ppm, et la valeur de W doit être minimisée pour perturber le moins possible la résonance des macromolécules à 1,7 ppm. Finalement, le compromis suivant a été adopté: $\delta_1=0.5\%$, $\delta_2=3\%$. On a alors $W=35$ Hz. La largeur de la bande d'inversion au maximum d'inversion a été fixée à 10 Hz (Ce paramètre n'influe que la puissance de l'impulsion).

I.3.3.3. Coupure de l'impulsion SLR par l'impulsion semisélective 2-2 : simulation

L'utilisation de l'impulsion SLR pour l'édition du GABA nécessite d'insérer une impulsion de refocalisation semisélective 2-2 au milieu de l'impulsion SLR. On peut légitimement se demander si le fait de combiner une impulsion semisélective 2-2 à l'impulsion SLR modifie les caractéristiques spectrales de chacune des impulsions prises séparément. Il convient de s'assurer notamment que ni l'inversion du signal à 1,9 ppm, ni la refocalisation du signal à 3,0 ppm ne sont perturbés. Ce problème a été analysé par simulation en calculant numériquement l'évolution de l'aimantation transversale d'un spin non couplé sous l'effet des impulsions 2-2 et SLR prises isolément, puis combinées. Un programme a été écrit en langage C pour permettre un calcul plus rapide qu'avec MATLAB. Ce programme calcule l'évolution des spins hors-résonance en présence d'un champ radiofréquence B_1 en utilisant les matrices de rotation [Bittoun-1987]. L'impulsion SLR, de la même façon qu'elle est émise par le spectromètre RMN, a été divisée en 128 impulsions élémentaires d'amplitude constante. Les effets de gradients de déphasage dans la séquence d'écho de spin ont été simulés en calculant simultanément l'évolution de 500 aimantations élémentaires pendant l'écho de spin. L'effet des gradients déphaseurs a été pris en compte en appliquant à chacune de ces aimantations une valeur différente de champ magnétique comprise entre 0 et 80000 Hz pendant 5 ms de part et d'autre de l'impulsion simulée.

Deux options sont possibles pour combiner l'impulsion 2-2 et l'impulsion SLR : soit l'impulsion semisélective 2-2 est insérée dans l'impulsion SLR sans l'interrompre, soit l'impulsion SLR est coupée en deux moitiés pour insérer l'impulsion 2-2 et le délai d'évolution τ . La Figure 46c montre que dans le premier cas, l'impulsion combinée 2-2+SLR ne refocalise pas toute l'aimantation à 3,0 ppm. La soustraction de la séquence sans impulsion SLR et avec impulsion SLR entraîne donc une erreur de soustraction de la créatine de l'ordre

de 7%. Notons que cette option a tout de même été retenue dans les études initiales de Rothman *et al.* dans lesquelles une impulsion 2-2 a été combinée avec une impulsion sélective de type DANTE [Morris-1978]. La perte de refocalisation sur la créatine (7%) provoquée par la combinaison des deux impulsions a été corrigée manuellement en ajustant le facteur d'échelle entre les deux spectres avant différence. Même si le profil fréquentiel de l'impulsion DANTE possède des lobes latéraux, la perte de refocalisation dans la combinaison 2-2+DANTE n'est pas due à une imperfection du profil du DANTE, mais au fait que l'impulsion DANTE n'est pas interrompue pendant le délai τ de l'impulsion 2-2.

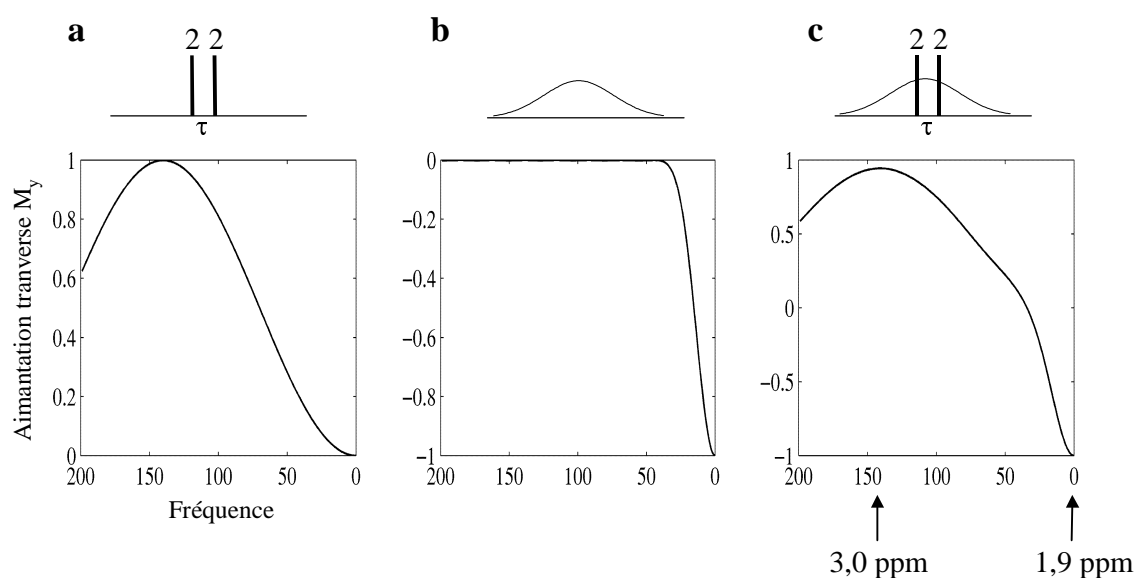


Figure 46. Effet résultant de la combinaison de l'impulsion 2-2 et de l'impulsion SLR lorsque l'impulsion SLR n'est pas interrompue pendant le délai τ . (a) Profil fréquentiel de l'impulsion 2-2 seule. (b) Profil fréquentiel de l'impulsion SLR seule (c) Profil fréquentiel de la combinaison des deux impulsions. La refocalisation de l'aimantation est incomplète à 3,0 ppm. L'aimantation au début de l'écho de spin est égale à M_y .

Considérons maintenant la deuxième possibilité. La Figure 47b montre que le seul fait de couper l'impulsion SLR en deux moitiés modifie le profil fréquentiel de l'impulsion à cause des effets de déplacement chimique pendant le délai τ . Cependant, contrairement au cas précédent, la combinaison de l'impulsion 2-2 et de l'impulsion SLR coupée en deux moitiés (Figure 47c) entraîne une refocalisation parfaite du signal à 3,0 ppm. La différence des séquences avec et sans impulsion SLR n'entraîne donc pas d'erreur de soustraction des spins non couplés. Ce résultat est en réalité tout à fait général : Shen *et al.* ont montré en effet que lorsqu'une impulsion symétrique quelconque est coupée par une impulsion semisélective 2-2 et qu'aucune impulsion n'est appliquée pendant le délai d'évolution τ , la refocalisation du

signal sous l'effet de la combinaison des deux impulsions est parfaite (sans perte d'intensité et sans déphasage) au maximum de l'impulsion 2-2 [Shen-1998].

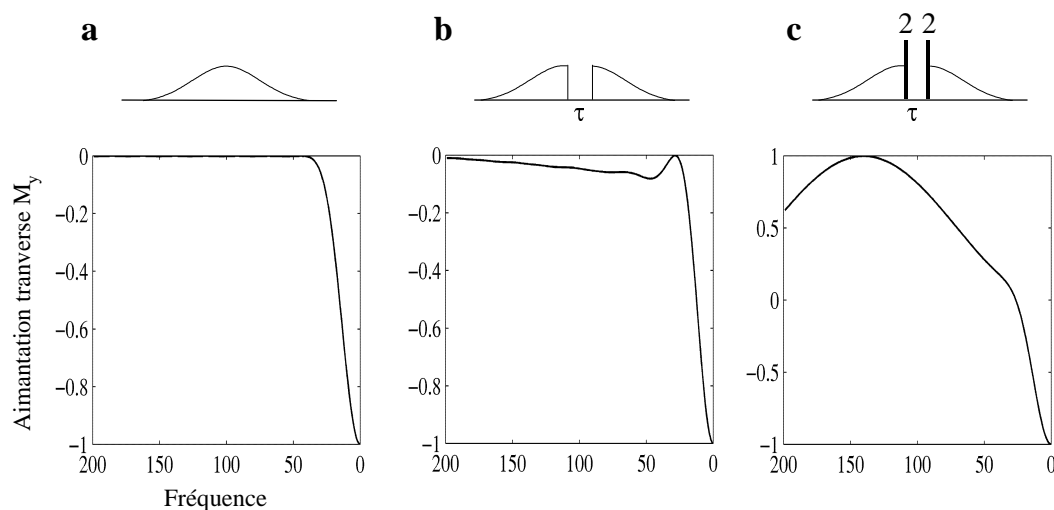


Figure 47. Effet résultant de la combinaison de l'impulsion 2-2 et de l'impulsion SLR lorsque l'impulsion SLR est interrompue pendant le délai τ . (a) profil fréquentiel de l'impulsion SLR seule (b) profil fréquentiel de l'impulsion SLR coupée en deux moitiés séparées par un délai τ . (c) profil fréquentiel de la combinaison de deux impulsions. L'aimantation est totalement refocalisée à 3,0 ppm.

Fréquence d'émission de l'impulsion semisélective 2-2

Dans les simulations qui précèdent, l'impulsion semisélective 2-2 barre (notée 2-2) et l'impulsion SLR sont appliquées à la même fréquence à 1,9 ppm. Or dans la méthode proposée d'édition du GABA sans contamination par les macromolécules, l'impulsion SLR doit être appliquée alternativement à 1,9 ppm et à 1,5 ppm. Pour préserver la symétrie de l'édition à 1,7 ppm dans les deux séquences, cruciale pour la bonne soustraction des macromolécules, le zéro du 2-2 a été placé à 1,7 ppm. La Figure 48b montre le profil fréquentiel de l'impulsion combinée 2-2 plus SLR lorsque l'impulsion SLR est appliquée à la résonance à 1,9 ppm et que l'impulsion 2-2 est appliquée à -0,2 ppm (soit -24 Hz) de la résonance, c'est-à-dire à 1,7 ppm. Le léger effet hors résonance de l'impulsion 2-2 à 1,7 ppm entraîne un décalage du maximum d'édition de 5 Hz vers les hautes-fréquences. Si cet effet n'est pas compensé, il introduit d'une part une perte d'efficacité d'édition à 1,9 ppm, d'autre part une asymétrie de l'édition des macromolécules à 1,7 ppm. Le maximum d'édition est déplacé de 5 Hz environ vers les hautes-fréquences.

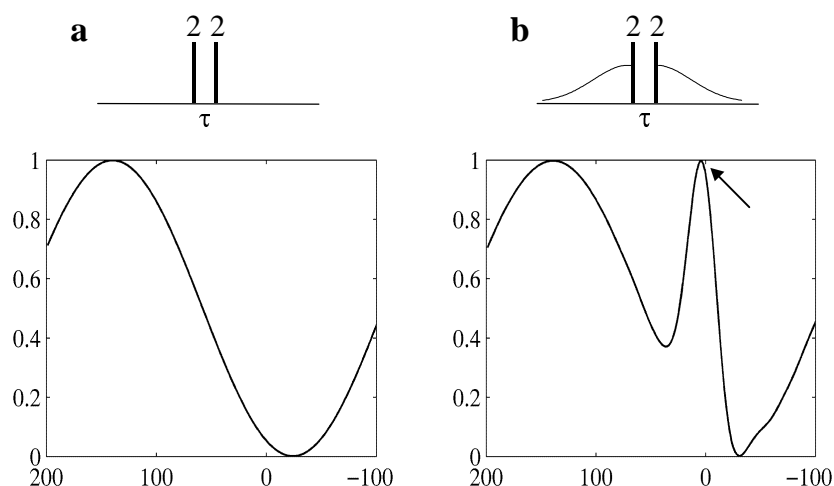


Figure 48. Effet du positionnement du zéro de l'impulsion 2-2 à 1,7 ppm. (a) Profil fréquentiel de l'impulsion 2-2 avec un zéro à 1,7 ppm (-24 Hz) et un maximum à 3,0 ppm (140 Hz). (b) Profil (en valeur absolue) de la combinaison de l'impulsion précédente avec une impulsion SLR appliquée à 1,9 ppm (0 Hz). Le maximum d'inversion de l'impulsion SLR est décalé de 5 Hz à cause des effets de l'impulsion semisélective à 1,9 ppm (flèche).

I.3.3.4. Spectroscopie RMN

Les spectres ont été acquis sur un spectromètre corps entier à 3 T équipé de gradients d'une intensité maximale de 10 mT/m avec un temps de montée de 600 μ s. Une antenne volumique en cage d'oiseau fabriquée au laboratoire (diamètre 15 cm, longueur 8 cm, 8 barreaux) a été utilisée pour l'émission et la réception RF. La localisation a été réalisée avec une séquence ISIS en trois dimensions (impulsion d'inversion sech tronquée à 5%, durée 8 ms, largeur de bande 2000 Hz) et une suppression de volume externe composée de six impulsions d'excitation sélectives SLR appliquées en présence d'un gradient et suivies de gradients de déphasage.

Le module d'édition du GABA consistait en une séquence d'écho de spin avec une tranche d'excitation dans la direction y (SLR 4 ms, ripple in 1%, ripple out 1%, largeur de bande à mi-hauteur 1600 Hz) pour éviter d'exciter la région très inhomogène des sinus, et une impulsion de refocalisation 2-2 barre semisélective (impulsion rectangulaire 90° 336 μ s) appliquée soit à 1,8 ppm (-352 Hz du pic de l'eau) pour la méthode de Yale, soit à 1,7 ppm (-364 Hz) pour la nouvelle méthode. Le délai τ de l'impulsion semisélective a été fixé de manière à placer le deuxième zéro d'excitation sur l'eau à 4,7 ppm. Ce délai τ a été diminué de 65 μ s, valeur déterminée par simulation, par rapport à la valeur théorique $1/2\Delta\nu$ pour

compenser l'évolution pendant la durée des impulsions. Pour la méthode de Yale l'impulsion d'édition (SLR durée 43,01 ms, ripple in 3%, ripple out 0,5%) était soit non appliquée (séquence A), soit appliquée à 1,9 ppm (-340 Hz de l'eau) (séquence B), soit appliquée 1,7 ppm (-364 Hz de l'eau) (séquence C). Pour la nouvelle méthode, l'impulsion d'édition a été appliquée successivement à 1,9 ppm (-340 Hz) (séquence A) et 1,5 ppm (-396 Hz) (séquence B'). La suppression d'eau a été améliorée en ajoutant un module CHES (impulsion gaussienne de 20 ms tronquée à 1%) avant les inversions de localisation ISIS. Le temps de répétition de la séquence était de 3 secondes. Les impulsions de l'écho de spin ont été calibrées en maximisant le signal de l'eau. L'impulsion d'édition a été calibrée avec une séquence d'ajustement comportant trois impulsions de refocalisation sélectives en présence de gradients de localisation successivement dans chaque direction x, y, z et en ajustant le gain de l'impulsion à calibrer placée en excitation pour minimiser le signal.

Pour les expériences *in vitro*, trois fantômes sphériques ont été utilisés, contenant du GABA seul, de la lysine seule, ou un mélange équimolaire des deux métabolites. La solution a été mélangée à un gel d'agarose (40 g/l) pour limiter les instabilités dues aux vibrations induites par les gradients. Les spectres *in vivo* ont été acquis sur un babouin (*Papio Papio*) anesthésié avec un mélange kétamine-xylazine, intubé et placé dans un support stéréotaxique équipé de barres d'oreille et d'une mentonnière. Une image sagittale en écho de gradient, puis une image transverse en écho de gradient avec inversion-récupération ont été acquises pour positionner un voxel de 33x14x12 mm (5,5 ml) bilatéralement dans le striatum.

L'homogénéité du champ a été optimisée *in vivo* avec FASTMAP pour obtenir une largeur de raie de l'eau de 6 à 7 Hz sur le voxel. La fréquence a été corrigée en temps réel pour compenser la dérive de fréquence liée à l'utilisation de FASTMAP. En outre, la fréquence de la créatine était mesurée automatiquement à la fin de l'accumulation de chaque spectre et l'erreur de fréquence par rapport à 3,0 ppm (soit -205 Hz de l'eau) corrigée pour l'acquisition du spectre suivant. En effet, il est difficile de gérer manuellement l'ajustement de fréquence entre deux spectres lorsque la fréquence de l'aimant dérive rapidement. La gestion automatique de cette correction entre deux spectres assure que la fréquence des métabolites est stable par rapport à la fréquence d'émission à 1 Hz près.

Après élargissement lorentzien de 5 Hz et transformée de Fourier, la résonance de GABA (G^* , M^* ou $G^{*'}\prime$) a été intégrée par rapport à la résonance de la créatine pour calculer

la concentration de GABA, en supposant la concentration de créatine égale à 8 mM. Pour la méthode Yale, les valeurs précises de e et s ont été calibrées sur des fantômes de GABA et de lysine, et les concentrations de GABA et de macromolécules ont été calculées par :

$$G = 1/\Delta \cdot [0,97 \times G^* - 0,43 \times M^*] \quad \text{avec } \Delta = 1,03 \times 0,97 - 0,43 \times 0,57 = 0,75$$

$$M = 1/\Delta \cdot [1,03 \times M^* - 0,57 \times G^*]$$

I.3.4. Résultats

I.3.4.1. Validation *in vitro*

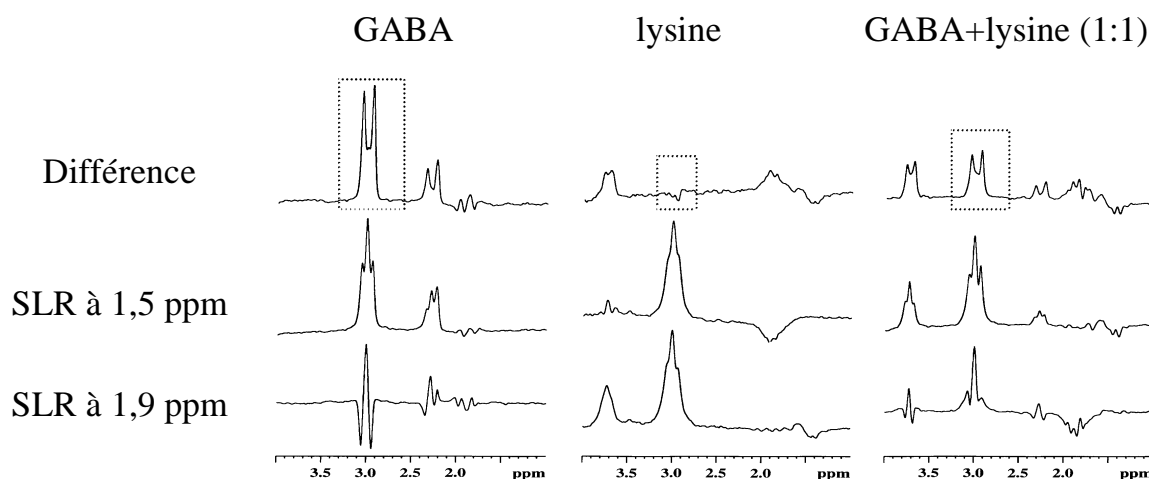


Figure 49. Validation *in vitro* de la nouvelle séquence d'édition du GABA sur des fantômes contenant du GABA (à gauche), de la lysine (au milieu) et un mélange équimolaire des deux composés (à droite). Les spectres de la ligne du bas ont été obtenus avec la séquence A (impulsion d'édition à 1,9 ppm) et ceux de la ligne du milieu avec la séquence B' (impulsion d'édition à 1,5 ppm). La ligne du haut montre le signal édité par la différence B'-A. Pour le fantôme de GABA, l'aire du pseudo-doublet à 3,0 ppm (B'-A) représente 99% de l'aire du triplet obtenu avec B'. Pour le fantôme de lysine, l'aire du résiduel à 3,0 ppm représente 1% de l'aire du triplet. Pour le mélange GABA:lysine, l'aire du pseudo-doublet à 3,0 ppm représente 49% de l'aire du triplet, ce qui correspond au rapport attendu d'après les concentrations respectives de GABA et de lysine.

Les résultats obtenus *in vitro* sur les fantômes contenant du GABA, de la lysine, et un mélange équimolaire des deux métabolites sont présentés sur la Figure 49. L'efficacité de la méthode d'édition proposée repose sur la stabilité du comportement de la résonance $C_{(6)}H_2$ de la lysine à 3,0 ppm lorsque l'impulsion d'édition est décalée de 1,9 ppm (séquence A) à 1,5 ppm (séquence B'). Le résiduel de lysine après soustraction représente 4% en intensité et seulement 1% en aire de la résonance de lysine non J-modulée (Figure 49, milieu). En revanche, le GABA est édité à 99% (Figure 49, à gauche). Par conséquent, le signal G^*

(différence B'-A) mesuré sur le mélange équimolaire GABA-lysine est exactement proportionnel à la concentration de GABA, avec une contamination négligeable par la lysine (Figure 49, à droite).

I.3.4.2. Validation *in vivo*

La Figure 50 montre les spectres de GABA obtenus *in vivo* sur un cerveau de singe. A cause de la suppression de la contamination par les macromolécules, la nouvelle méthode fournit un signal G*' à 3,0 ppm nettement moins intense que le signal G* obtenu avec la méthode de Yale. Cependant, les concentrations de GABA calculées avec les deux méthodes sont comparables, environ 0,5 mM, en supposant une concentration de créatine de 8 mM. La différence importante entre G* et G*' s'explique par la concentration élevée de macromolécules, environ 2,5 mM.

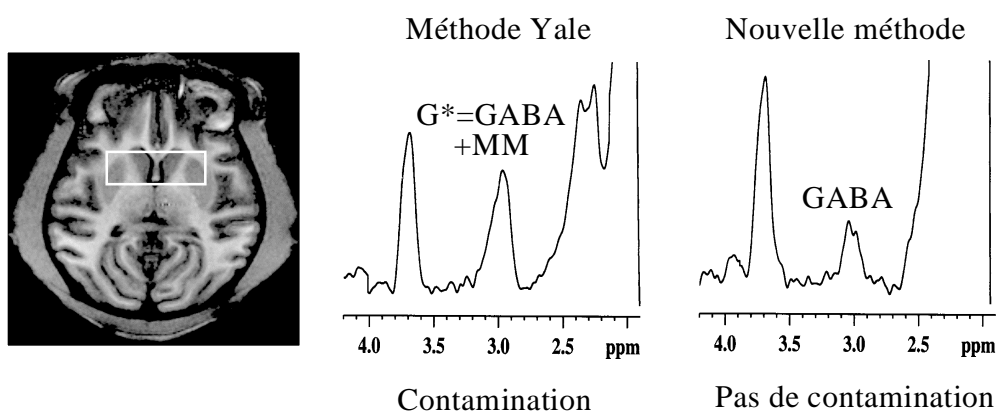


Figure 50. Position du volume d'intérêt sur une image axiale pondérée en T_1 (à gauche) et spectres acquis sur le striatum d'un babouin anesthésié en utilisant la séquence d'édition du GABA qui a été majoritairement utilisée jusqu'à présent (au milieu) et avec la nouvelle méthode (à droite). Le même nombre de répétitions (1440) a été accumulé pour chacune des deux méthodes avec un temps de répétition de 2,5 s. Les spectres ont été traités avec un élargissement lorentzien de 5 Hz.

I.3.5. Discussion et conclusion

Nous avons décrit une nouvelle méthode pour détecter le GABA sans contamination par les macromolécules, comme c'est le cas avec les techniques proposées jusqu'à présent. Le principe est d'affecter la résonance des macromolécules à 1,7 ppm de la même façon dans les deux acquisitions de l'édition par différence (séquences A et B') de manière à éliminer cette résonance dans la différence et à ne conserver que le signal de GABA. Parce que seuls deux

spectres sont nécessaires, au lieu de trois (voire quatre) dans la méthode développée à l'université de Yale, notre méthode apporte un gain de 33% en temps expérimental. Le fait que le signal $G^{*'}$ détecté sur la différence (B'-A) soit moins intense que le signal G^* détecté sur (B-A) ne doit pas être interprété comme une précision moins bonne de notre méthode. Au contraire, on peut montrer facilement par un calcul de propagation d'erreur que la nouvelle approche offre un gain d'un facteur 1,3 à 2 en précision, en plus du gain de 33% en temps. Il semble en effet raisonnable de supposer que, en mesurant G^* , M^* et $G^{*'}$, l'incertitude absolue (notée U) reste la même puisque le bruit est identique. Avec notre méthode, l'incertitude finale sur la concentration de GABA vaut U puisque qu'il s'agit d'une mesure directe. En revanche, avec l'ancienne méthode, l'incertitude finale sur le signal G de GABA après correction est proportionnelle à $U \cdot (e+s)/(e^2-s^2)$ parce que deux mesures séparées sont effectuées et que la valeur de G est obtenue à partir de G^* et M^* . Par conséquent, avec e proche de 1 et s variant de 0,25 à 0,5 suivant les études, l'incertitude finale sur G varie entre $1,3xU$ et $2xU$.

Une contrainte critique pour l'efficacité de la nouvelle méthode d'édition du GABA *in vivo* est la symétrie d'excitation de la résonance de macromolécules à 1,7 ppm, lorsque l'impulsion d'édition est appliquée successivement à 1,9 ppm et 1,5 ppm. Ceci suppose un ajustement parfait des offsets de fréquence pour l'impulsion 2-2 et pour l'impulsion sélective d'édition. Ces paramètres ont donc été soigneusement optimisés par simulation numérique, puis *in vitro* en utilisant la lysine pour simuler les macromolécules. Toute erreur d'ajustement de la fréquence d'émission pendant l'acquisition des spectres induit une contamination du signal $G^{*'}$ à cause d'une assymétrie de l'excitation de la résonance de macromolécules à 1,7 ppm. Il faut noter cependant que cette source d'erreur potentielle n'est pas spécifique de la nouvelle méthode. Avec la méthode de Yale, les facteurs e et s utilisés pour calculer G et M à partir de G^* et M^* sont également déterminés par calibration *in vitro*. Par conséquent, toute erreur dans l'ajustement de la fréquence d'émission des impulsions entraîne une erreur dans l'estimation de G à cause de valeurs inexacts de e et s.

En conclusion, la nouvelle méthode d'édition du GABA proposée offre une réduction significative du temps d'acquisition ainsi qu'un gain en précision, sans pour autant éliminer la sensibilité des méthodes d'édition par différence vis-à-vis des petites erreurs d'ajustement de la fréquence d'émission des impulsions RF.

Deuxième partie

Application au modèle animal

3-NP de la maladie de Huntington

II.1. Le modèle 3-NP de la maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire à transmission autosomique dominante qui se caractérise par des mouvements anormaux (dyskinésie), des déficits cognitifs et des troubles psychiatriques associés à une atrophie progressive du striatum. Les premiers symptômes apparaissent en général vers 30-40 ans et la maladie évolue sur 15 à 20 ans vers une issue fatale. La prévalence des cas de MH cliniquement identifiés est proche de 1/10000 dans les pays occidentaux. Le gène responsable de la maladie a été identifié sur le chromosome 4 et la mutation observée dans la MH consiste en une répétition anormale de triplets CAG dans la partie codante du gène. La fonction de la protéine normale codée par ce gène, la huntingtine, ainsi que les mécanismes physiopathologiques reliant la mutation de la protéine à la mort neuronale, demeurent largement inconnus.

La manifestation neuropathologique la plus frappante de la MH est la neurodégénérescence sélective du striatum. Cette dégénérescence touche de manière préférentielle les neurones GABAergiques épineux de taille moyenne qui constituent 96% du striatum, alors que les autres populations de cellules striatales sont relativement préservées. Les mécanismes conduisant à la dégénérescence ne sont pas encore connus. Néanmoins, l'excitotoxicité, c'est-à-dire les effets délétères sur les neurones d'une activation excessive des récepteurs du glutamate, semble jouer un rôle important dans le développement des lésions. Récemment, cette hypothèse a été reformulée dans le concept *d'excitotoxicité indirecte* qui suggère qu'un déficit énergétique précoce pourrait induire une excitotoxicité chronique même en présence de concentrations physiologiques de glutamate. Le déficit énergétique entraînerait en effet une dépolarisation membranaire et un déblocage des canaux NMDA. De fait, les lésions provoquées par un déficit énergétique sont diminuées par l'injection d'antagonistes du récepteur NMDA (MK-801, APV) ou bien lorsque les fibres corticostriatales glutamatergiques afférentes sont supprimées.

Plusieurs observations chez les patients atteints de la MH vont dans le sens d'une altération du métabolisme énergétique. Premièrement, ces patients présentent à un stade avancé de la maladie un état d'affaiblissement et d'amaigrissement (cachexie) malgré un

régime alimentaire normal. De plus, des études en TEP utilisant du fluoro-déoxyglucose (FDG) ont montré que le métabolisme cérébral du glucose est diminué dans le striatum des patients, même en l'absence de perte neuronale importante [Martin-1992]. Enfin, la spectroscopie RMN a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration de lactate, non seulement dans le striatum, mais également dans le cortex, une région qui ne dégénère habituellement pas [Jenkins-1998]. Cette dernière observation suggère une altération générale du métabolisme oxydatif et une réorientation de la production d'énergie vers la voie anaérobie.

Chez l'animal, de nombreux éléments vont également dans le sens d'une excitotoxicité indirecte consécutive à un déficit énergétique. Tout d'abord, l'injection directe dans le striatum de rat d'agonistes des récepteurs NMDA, tels le kaïnate ou le quinolinate, produit des lésions qui ressemblent à celles de la MH. De plus, l'inhibition de la succinate déshydrogénase (SDH), une enzyme appartenant au cycle de Krebs et au complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale et qui joue donc un rôle clé dans la production d'énergie par l'oxydation du glucose, provoque également des lésions rappelant celles de la MH. C'est le cas notamment si l'on injecte directement dans le striatum du malonate ou du 3-NP, deux inhibiteurs de la SDH. Le 3-NP administré par voie systémique produit également des lésions sélectives dans le striatum [Beal-1993]. A partir de cette dernière observation, un modèle phénotypique de la MH a été développé par injection systémique chronique de 3-NP aussi bien chez le rat que chez le singe (pour revue [Brouillet-1999]). En effet, l'injection systémique aiguë de 3-NP produit bien des lésions spécifiques dans le striatum, mais elle ne reproduit pas les caractéristiques histologiques de la dégénérescence telle qu'elle est observée dans la MH. En revanche, l'intoxication chronique au 3-NP reproduit la plupart de ces caractéristiques et provoque, en particulier chez le singe, l'apparition de symptômes très proches de ceux observés chez les patients atteints de la MH [Brouillet-1995].

Ces dernières années, le modèle animal par intoxication chronique au 3-NP a donc été utilisé pour tenter de mieux comprendre l'origine de la dégénérescence striatale dans la MH. Il a été rapporté notamment que l'inhibition de la SDH due au 3-NP est non sélective : l'injection d'une dose de 25 mg/kg de 3-NP chez le rat entraîne une inhibition de la SDH de l'ordre de 50% dans la plupart des régions du cerveau pendant 24 à 48 heures [Brouillet-1998]. La dégénérescence du striatum ne s'explique donc pas par une inhibition plus importante de la SDH dans cette région, mais bien par une vulnérabilité particulière du striatum à un déficit

énergétique. L'un des enjeux de la recherche actuelle est de comprendre les raisons de cette vulnérabilité sélective.

En conclusion, l'administration chronique de 3-NP reproduit de manière remarquable le phénotype neurodégénératif de la MH. En particulier, la dégénérescence sélective du striatum ainsi que la vulnérabilité croissante avec l'âge peuvent être étudiés. Bien qu'ils ne soient pas fondés sur l'anomalie génétique sous-jacente à la maladie, les modèles phénotypiques sont donc utiles pour tenter de comprendre les mécanismes conduisant à la mort neuronale sélective dans le striatum. Même si des modèles de souris transgéniques sont actuellement développés en remplaçant le gène de la huntingtine par un gène muté contenant une répétition anormale de triplets CAG, le modèle phénotypique chez le primate permet de tester des stratégies thérapeutiques chez des animaux possédant une anatomie cérébrale et un répertoire comportemental proche de ceux de l'homme.

II.2. Spectroscopie proton simple et modèle 3-NP

II.2.1. Introduction

La spectroscopie RMN du proton offre la possibilité de mesurer *in vivo* la concentration de nombreux métabolites. Elle permet ainsi d'étudier certains aspects de la biochimie du cerveau dans des conditions normales et pathologiques. Cependant, la quantification des métabolites cérébraux sur un spectre proton obtenu *in vivo* est rendue particulièrement difficile par la faible dispersion spectrale et la largeur de raie importante. Le spectre se simplifie considérablement en détectant le signal avec une séquence d'écho de spin à un temps d'écho relativement long (supérieur à 50 ms) : l'intensité des résonances correspondant aux protons couplés diminue alors fortement à cause de la J-modulation et le spectre est dominé par les singulets des protons non couplés de la choline (3,2 ppm), de la créatine (3,0 ppm) et du NAA (2,0 ppm). Cette simplification du spectre à temps d'écho long entraîne cependant une perte d'information biochimique à cause de la disparition des résonances couplées et une perte de rapport signal-sur-bruit à cause de la relaxation (voir les spectres de la Figure 52). Malgré la J-modulation, il est possible de détecter également le signal de lactate en choisissant un temps d'écho égal à 135 ms ou 270 ms. Le doublet du lactate à 1,33 ppm ($J_{HH}=7$ Hz) est en opposition de phase par rapport aux résonances non couplées à TE=135 ms et en phase à TE=270 ms.

Outre la simplification spectrale, la spectroscopie à temps d'écho long permet d'atténuer fortement une éventuelle contamination du spectre par les lipides sous cutanés qui possèdent un temps de relaxation T_2 court, imposant ainsi moins de contraintes sur la qualité de la localisation. La ligne de base est également simplifiée par la disparition du signal provenant des macromolécules, ce qui facilite la quantification des métabolites. Enfin, à temps d'écho long, les résonances ne sont pas déformées par les courants de Foucault dus à des impulsions de gradients appliquées trop peu de temps avant le début de l'acquisition, même si ces derniers peuvent être corrigés facilement. Pour ces raisons, la plupart des études physiopathologiques par spectroscopie RMN menées *in vivo*, chez l'homme et chez l'animal, se limitent à la détection de la choline, de la créatine, du NAA et parfois du lactate.

La reproductibilité et la signification biologique des résultats obtenus dans de telles études dépendent beaucoup de la qualité de la localisation et de la procédure de quantification du signal obtenu. Les techniques de localisation permettent de restreindre la mesure à une région déterminée du cerveau. Les plus utilisées sont les séquences de localisation à scan unique STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode) [Frahm-1987] et PRESS (Point RESolved Spectroscopy) [Bottomley-1987] à cause de leur moindre sensibilité au mouvement. De plus, il est souvent nécessaire d'ajouter à la séquence un module de suppression du volume externe pour améliorer la localisation.

La quantification des métabolites se heurte à plusieurs difficultés [Michaelis-1993]. Tout d'abord, les singulets détectés ne correspondent pas à un seul métabolite [Miller-1991]. Le pic à 3,0 ppm est la somme de la créatine et de la phosphocréatine. Le pic de NAA provient du NAA et du NAAG. Enfin, le pic de choline provient de plusieurs dérivés. Par ailleurs, la quantification des métabolites nécessite une référence de concentration. Celle-ci peut être soit interne, soit externe au volume d'intérêt (pour revue [Henriksen-1995]). Le pic de créatine a souvent été pris comme référence interne de concentration en exprimant les résultats sous forme de rapport NAA/Cr et Cho/Cr. Cependant, dans de nombreuses pathologies et notamment dans les maladies neurodégénératives, la concentration de créatine est susceptible d'être modifiée, et il est préférable de mesurer la concentration absolue de chaque métabolite. Pour ce faire, il est possible de prendre le pic d'eau tissulaire comme référence interne de concentration [Ernst-1993a] [Ernst-1993b].

La spectroscopie RMN a déjà été utilisée à plusieurs reprises pour étudier les modifications métaboliques dans des maladies neurodégénératives, en particulier la sclérose en plaques [Larsson-1991], la maladie de Parkinson [Holshouser-1995] et la maladie d'Alzheimer [Moats-1994]. La maladie de Huntington a elle-même fait l'objet de plusieurs études. Jenkins *et al.* ont montré une augmentation du rapport lactate/créatine et choline/créatine ainsi qu'une baisse du rapport NAA/créatine dans le striatum de patients [Jenkins-1993]. Ces modifications métaboliques, rapportées à l'âge, sont corrélées au nombre de triplets CAG dans le gène de la huntingtine [Jenkins-1998]. Une étude récente réalisée avec une quantification absolue a montré que les concentrations de créatine et de NAA baissent dans le striatum de patients et que cette baisse est corrélée à la sévérité des symptômes [Sanchez-Pernaute-1999]. Par ailleurs, la spectroscopie RMN peut être utilisée pour évaluer des traitements neuroprotecteurs. Une étude effectuée par Ross *et al.* suggère ainsi que les

greffes de neurones de fœtus dans le striatum de patients survivent après transplantation [Ross-1999].

Plusieurs études par spectroscopie RMN ont également été menées chez des modèles animaux de la maladie de Huntington. L'injection directe de malonate ou de 3-NP dans le striatum de rats provoque une diminution de la concentration de NAA et une augmentation de la concentration de lactate mesurées par imagerie de déplacement chimique [Jenkins-1996]. Une injection aiguë de 3-NP par voie intraveineuse entraîne dans les deux heures qui suivent une hausse du succinate, du lactate et de l'acétate ainsi qu'une baisse du NAA par rapport à la créatine et une hausse du coefficient de diffusion dans le striatum de rat [Lee-2000]. Une étude chez des souris transgéniques dont le gène de la huntingtine contient une répétition anormale de triplets CAG montre une baisse du NAA et du glutamate et une hausse de la glutamine [Jenkins-2000]. Enfin, une intoxication chronique au 3-NP chez le singe entraîne une baisse du NAA et une hausse du lactate dans le striatum [Dautry-1999]. Aucune hausse de la concentration de lactate n'est en revanche notée dans le cortex. Ces données soulignent l'intérêt de la spectroscopie RMN non seulement pour trouver des corrélations entre des altérations métaboliques et des symptômes de la maladie, mais également pour comprendre les mécanismes biochimiques impliqués dans la neurodégénérescence sélective du striatum.

Dans ce contexte, cette partie présente deux études effectuées chez l'animal par spectroscopie RMN à temps d'écho long. La première étude montre que le NAA est marqueur réversible de dysfonctionnement neuronal chez le rat et chez le babouin intoxiqués de façon chronique au 3-NP. La deuxième étude s'intéresse aux effets neuroprotecteurs de la créatine. Auparavant, les développements méthodologiques RMN communs à ces deux études seront présentés.

II.2.2. Spectroscopie *in vivo* chez le rat et le primate à 3 Tesla : matériels et méthodes

Spectroscopie PRESS chez le rat

Les mesures de spectroscopie RMN chez le rat ont été effectuées à 3 T avec une bobine de gradients d'une intensité maximale de 25 mT/m et un temps de montée de 170 μ s. Les rats ont été positionnés sur le ventre et maintenus par des barres d'oreille et une barre à dents. L'émission et la réception RF ont été réalisées avec une sonde de surface circulaire de diamètre 1 cm positionnée au dessus de la tête du rat. Une image sagittale acquise en écho de gradient (champ de vue 8x8 cm) et une image coronale acquise au moyen d'une séquence d'écho de gradient précédée d'une inversion-récupération ont servi à positionner le volume d'intérêt (10x4x4 mm dans le striatum ou 7x2x7 mm dans le cortex) pour la spectroscopie localisée.

Une séquence PRESS comprenant une impulsion 90° et deux impulsions 180° modulées en amplitude par une fonction sinus cardinal à 5 lobes a été utilisée pour la localisation, sélectionnant successivement une tranche perpendiculaire à z, x et y. La durée respective des impulsions 90° et 180° était de 3 ms et 2,25 ms afin d'avoir une bande passante identique de 2000 Hz pour les deux impulsions. Des gradients appliqués à 80% de l'intensité maximale pendant 3 ms de part et d'autre de chaque impulsion 180° ont servi à déphaser le signal non refocalisé par l'écho de spin. La suppression du volume externe a été améliorée en appliquant six impulsions 90° sélectives en présence d'un gradient pour saturer le signal dans six tranches de 1 cm de part et d'autre du volume d'intérêt dans chacune des trois directions x, y et z (Figure 51). Pour cette suppression du volume externe, une impulsion sech "full passage" (tronquée à 5%, durée 2 ms, largeur spectrale 6000 Hz) a été utilisée comme 90° de façon non adiabatique. La puissance des impulsions de suppression du volume externe dans chaque direction a été calibrée lors de chaque expérience en observant le profil obtenu grâce à un gradient de lecture appliqué pendant l'acquisition (6250 Hz/cm).

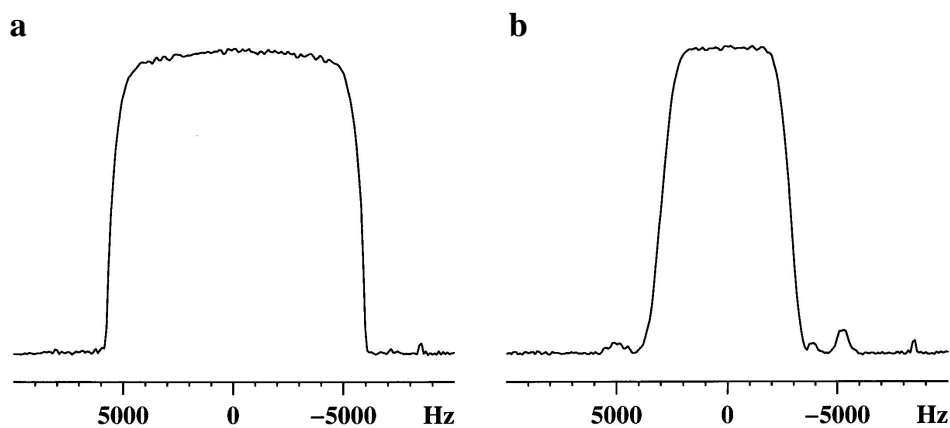


Figure 51. Profil obtenu en présence d'un gradient de lecture dans la direction z sur une sphère de 2 cm avec une sonde de détection homogène (a) sans et (b) avec suppression du volume externe pour localiser une tranche de 1 cm d'épaisseur. La suppression du volume externe élimine presque complètement le signal en dehors de la tranche.

La suppression du signal de l'eau a été réalisée par un module CHES [Haase-1985] placé avant la suppression de volume externe en utilisant une impulsion gaussienne (tronquée à 1%, durée 25 ms). La fréquence d'émission de toutes les impulsions, exceptée l'impulsion de suppression du pic de l'eau, a été placée à 2,3 ppm pour minimiser les artefacts de déplacement chimique. Cette séquence permet d'obtenir une localisation de bonne qualité chez le rat intact avec détection en sonde de surface, comme l'indique la faible contamination des spectres par le signal des lipides sous-cutanés (Figure 52).

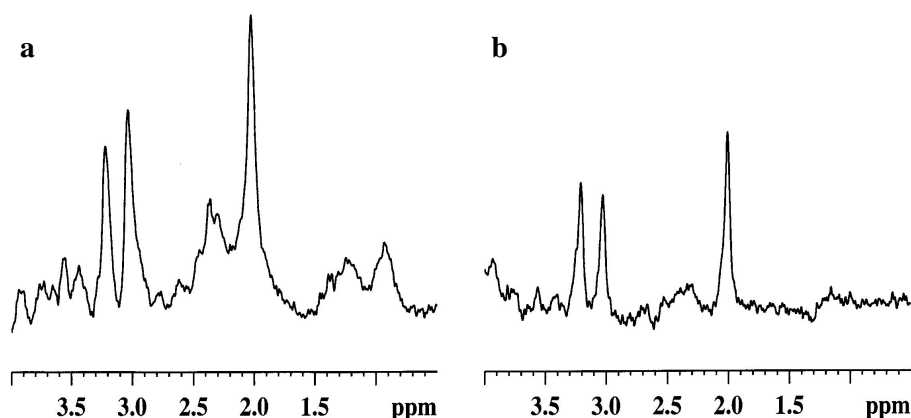


Figure 52. Spectres PRESS obtenus sur le striatum de rat avec une sonde de surface (\varnothing 1 cm) dans un volume de 10x4x4 mm à temps d'écho (a) TE=30 ms et (b) TE=135 ms. Chaque spectre est la somme de 256 répétitions (TR 2,5 s) et a été traité avec un élargissement lorentzien de 1 Hz. Le spectre à TE=30 ms a été corrigé pour les courants de Foucault (routine VRAP de Bruker). L'échelle verticale est la même en (a) et (b).

Spectroscopie PRESS chez le primate

Les mesures de spectroscopie RMN chez le primate ont été menées à 3 T avec une bobine de gradient corps-entier d'une intensité maximale de 10 mT/m et de temps de montée 600 μ s. Les singes ont été positionnés sur le dos, la tête étant maintenue par un support stéréotaxique permettant un repositionnement identique de la tête d'un l'animal lors d'un suivi longitudinal. Une sonde de type cage d'oiseau (diamètre 15 cm, longueur 8 cm, 8 barreaux) fabriquée au laboratoire a été utilisée pour l'émission et la réception RF. Une image sagittale avec une séquence d'écho de gradient et une image coronale avec une séquence d'écho de gradient précédée d'une inversion-récupération ont servi à positionner le volume d'intérêt (32,5x13,3x11,5 mm dans le striatum ou dans le cortex) pour la spectroscopie localisée.

Une séquence PRESS sélectionnant trois tranches successivement en Z, X et Y a été utilisée pour la localisation. La durée des impulsions 90° et 180°, modulées en amplitude par un sinus cardinal à cinq lobes, a été choisie égale à 5 ms et 3,75 ms respectivement, conduisant à une largeur spectrale de 1175 Hz identique pour les deux impulsions. Des gradients appliqués à 80% de l'intensité maximale pendant 3 ms de part et d'autre de chaque impulsion 180° ont servi à déphaser le signal non refocalisé par l'écho de spin. La suppression du volume externe a été améliorée en appliquant sept impulsions 90° sélectives en présence d'un gradient pour saturer le signal dans des tranches adjacentes au volume d'intérêt. Pour cette suppression du volume externe, une impulsion SLR (tronquée à 5%, durée 2 ms, largeur spectrale 6000 Hz) a été utilisée. La puissance des impulsions de suppression du volume externe dans chaque direction a été calibrée à chaque expérience sur un profil grâce à un gradient de lecture pendant l'acquisition. La suppression du signal de l'eau a été réalisée par un module CHESS placé avant la suppression de volume externe en utilisant une impulsion gaussienne (tronquée à 1%, durée 25 ms).

II.2.3. Première étude : le NAA comme marqueur réversible de dysfonctionnement neuronal

Une étude entreprise par l'équipe de l'URA CEA-CNRS 2210 en collaboration avec le groupe RMN a montré récemment que le N-acétyl-aspartate (NAA) n'est pas seulement un marqueur de mort neuronale, mais aussi un marqueur *réversible* de *dysfonctionnement* neuronal chez les rats et les primates traités de manière chronique par le 3-NP. Ce travail associe des mesures par spectroscopie RMN *in vitro* sur des extraits de cerveau de rat, des mesures par spectroscopie RMN *in vivo* chez le primate, des mesures histochimiques (inhibition de la SDH et méthode TUNEL) et des méthodes immunohistochimiques (NeuN, calbindin-D28k). Notre contribution à ce travail a consisté à développer les outils méthodologiques nécessaires à la spectroscopie RMN *in vivo* chez le primate, puis à mettre en œuvre cette technique lors du suivi longitudinal de babouins pendant une intoxication chronique au 3-NP. Plus précisément, nous avons développé sur le spectromètre Bruker 3 T la séquence de spectroscopie localisée PRESS avec suppression du volume externe, la méthode de correction automatique de l'homogénéité du champ magnétique (FASTMAP) avec suppression des lipides de la région oculaire, et la méthode de correction automatique de la dérive de fréquence (Chapitre I.1.). Tous ces développements ont permis d'obtenir chez le singe une spectroscopie proton à TE 135 ms de bonne qualité et la quantification des trois métabolites choline, créatine et NAA. L'article rapportant les résultats de cette étude est présenté dans les pages qui suivent.

NB : *Les pages 122 à 134 reproduisent la publication suivante :*

Dautry, C., Vaufrey, F., Brouillet, E., Bizat, N., Henry, P.-G., Condé, F., Bloch, G. and Hantraye, P. (2000). **Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal death in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:789-799.

II.2.4. Deuxième étude : effet d'une supplémentation en créatine chez le rat et le primate

La principale hypothèse avancée pour expliquer la maladie de Huntington est une excitotoxicité provoquée par un déficit énergétique chronique. Les composés permettant d'augmenter ou de maintenir les réserves énergétiques cérébrales pourraient donc avoir un effet neuroprotecteur. En particulier, la créatine est impliquée dans la régulation de la production et de la répartition d'énergie dans la cellule à travers le système tampon créatine/créatine kinase. Une supplémentation de l'alimentation par 1% ou 2% de créatine chez le rat protège contre des lésions focales par injection intrastriatale de malonate et contre une intoxication systémique au 3-NP [Matthews-1998] [Malcon-2000]. De même, une supplémentation à 1% ou 2% en créatine (une dose de 1% correspond environ à 125 mg/kg/jour) ralentit le développement des lésions dans un modèle de souris transgénique de la maladie de Huntington [Ferrante-2000]. Dans ces études, la neuroprotection est plus faible lorsque la supplémentation en créatine est portée à 3%, suggérant une réponse dose-effet en cloche avec un effet neuroprotecteur maximal pour une supplémentation à 2% et un effet neuroprotecteur plus faible, voire un effet protoxique de la créatine à des doses supérieures.

Dans ce contexte, la spectroscopie RMN peut être utilisée d'une part pour mesurer la hausse de la concentration de créatine après une supplémentation en créatine, d'autre part pour évaluer l'effet neuroprotecteur de la créatine en utilisant notamment le NAA comme marqueur de dysfonctionnement neuronal. L'effet d'une supplémentation en créatine sur le spectre RMN varie suivant les études. Une étude menée chez l'homme montre que le signal du singulet de la créatine à 3,0 ppm augmente de 9% après consommation orale de créatine à une dose de 20 g/jour pendant 4 semaines [Dechent-1999]. Chez le rat, une augmentation du pic de créatine a été mise en évidence avec une supplémentation importante de 2,2 à 2,5 g/kg/jour pendant 10 jours [Michaelis-1999] [Wick-1999]. Cependant, cette dose est très supérieure aux doses de créatine supposées neuroprotectrices lors d'une intoxication au 3-NP chez le rat (environ 200 mg/kg/jour).

Un éventuel essai clinique chez des patients atteints de la maladie de Huntington nécessite de déterminer la dose de créatine potentiellement neuroprotectrice, en évitant

d'administrer une dose trop forte qui risque d'aggraver les symptômes. Plusieurs études par spectroscopie RMN ont été initiées par l'URA CEA-CNRS pour trouver une réponse à cette question, en collaboration avec le groupe RMN du SHFJ. Deux de ces études, l'une chez le singe *in vivo*, l'autre chez le rat *ex vivo*, sont décrites dans la thèse de C. Dautry et nous en rappelons simplement les principaux résultats [Dautry-2000a].

Etude n°1. Effet d'une supplémentation en créatine chez le singe in vivo

Six babouins ont été répartis en deux groupes de trois animaux. Un groupe a été nourri avec des granulés contenant 1% en poids de créatine pendant 4 semaines (en tenant compte de la quantité d'aliment ingérée, la dose quotidienne de créatine en mg/kg absorbée par les singes avec des granulés contenant 1% de créatine est équivalente à celle absorbée par les rats avec des granulés contenant 2% de créatine). Puis tous les animaux ont subi une intoxication systémique au 3-NP. Les résultats montrent que le pic de créatine augmente de 20% dans le groupe supplémenté par rapport au groupe contrôle avant traitement au 3-NP, et que cette supplémentation en créatine possède un effet protoxique lors de l'intoxication au 3-NP. Il se pourrait donc que la dose de créatine administrée soit déjà trop élevée pour obtenir un effet neuroprotecteur.

Etude n°2. Effet d'une supplémentation en créatine chez le rat ex vivo

Trente deux rats mâles Lewis ont été répartis en 4 groupes : un groupe contrôle, un groupe créatine, un groupe 3-NP et un groupe créatine+3-NP. Le groupe créatine a reçu une dose quotidienne de 600 mg/kg de créatine par gavage gastrique pendant 19 jours. Le groupe 3-NP a reçu une dose de 38 mg/kg/jour de 3-NP délivrée par une pompe osmotique sous-cutanée pendant 4 jours. Le groupe créatine+3-NP a tout d'abord été supplémenté en créatine (600 mg/kg/jour pendant 15 jours) puis intoxiqué au 3-NP (38 mg/kg/jour pendant 4 jours). La supplémentation en créatine a été poursuivie pendant l'intoxication. A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés et les cerveaux préparés pour la mesure en spectroscopie RMN haute résolution à 7 T.

Les résultats montrent que la supplémentation en créatine n'a aucun effet mesurable en spectroscopie RMN sur le groupe créatine par rapport au groupe contrôle (notamment pas d'augmentation du pic de créatine). En revanche, les effets du 3-NP sont aggravés dans le

groupe créatine+3-NP par rapport au groupe 3-NP : la baisse de NAA, de glutamate et d'aspartate est amplifiée.

Il est surprenant de constater que la supplémentation en créatine augmente le pic de créatine par spectroscopie RMN chez le singe *in vivo* alors que ce pic n'augmente pas dans le même type d'étude chez le rat *ex vivo*. Une troisième étude a été entreprise chez le rat *in vivo* pour vérifier qu'il n'y avait pas d'effet spécifique *in vivo* pouvant expliquer ces résultats différents.

Etude n°3. Effet d'une supplémentation en créatine chez le rat in vivo.

Dix rats mâles Sprague-Dawley ont été répartis en deux groupes. Un premier groupe de cinq animaux a servi de contrôle et un deuxième groupe a reçu une dose quotidienne de 600 mg/kg de créatine pendant 4 jours (2 animaux) ou 5 jours (3 animaux). Le cinquième jour, des spectres ont été acquis *in vivo* à 3 T dans le striatum (volume 10x4x4 mm). Les spectres ont été acquis avec TE=135 ms, TR=2,5 s et un total de 3x256 répétitions. Le traitement des spectres a consisté en un élargissement lorentzien de 1 Hz et une ligne de base manuelle. L'aire des pics de NAA et de choline a été rapportée à l'aire de la créatine. Les résultats (Tableau 1) montrent une tendance à la hausse du signal de créatine de l'ordre de 10% mais cette tendance n'est pas statistiquement significative (test-t non apparié, p=0,1).

	Cr/NAA
Groupe contrôle (n=5)	0,84±0,09
Groupe créatine (n=5)	0,92±0,03

Tableau 1. Concentrations de NAA mesurées in vivo par rapport à la créatine chez un groupe de rats contrôle et un groupe de rats supplémentés par gavage gastrique pendant 4 à 5 jours avec 600 mg/kg/jour de créatine.

En conclusion, plusieurs questions restent encore sans réponse claire. Tout d'abord, quel est l'effet d'une supplémentation en créatine sur le pic mesuré par spectroscopie RMN à 3,0 ppm ? Cet effet dépend-il de l'espèce animale considérée, de la durée de la supplémentation, du mode d'administration (supplémentation dans la nourriture, gavage gastrique, injection ip) ? Quelle est la contribution respective des variations des deux composés créatine et

phosphocréatine qui constituent le pic à 3,0 ppm ? Enfin, puisqu'il semble y avoir un effet protoxique de la créatine, comment déterminer la dose optimale pour un éventuel effet neuroprotecteur, sachant que cette dose peut varier d'une espèce à l'autre. Ces questions méritent d'être posées et résolues avant de conduire des essais thérapeutiques chez l'homme.

II.3. Mesure de la vitesse du cycle de Krebs après une intoxication aiguë au 3-NP chez le rat

II.3.1. Introduction

Etude du cycle de Krebs par spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN permet d'étudier le cycle de Krebs *in vivo* en détectant le marquage isotopique de métabolites à partir d'un précurseur marqué. Cette approche a été beaucoup utilisée pour étudier le métabolisme énergétique cardiaque. Le cœur présente l'avantage de pouvoir fonctionner longtemps *ex vivo* et beaucoup d'équipes ont étudié le cœur isolé et perfusé par spectroscopie RMN en utilisant comme précurseur de l'acétate marqué au ^{13}C [Sherry-1994]. L'application de cette approche à la biochimie complexe du cerveau est en plein développement. Le glucose est la principale source d'énergie du cerveau [Magistretti-1999]. La quasi-totalité du glucose est oxydée en CO_2 et en eau par la glycolyse puis par le cycle de Krebs. La spectroscopie RMN offre la possibilité de suivre le marquage ^{13}C de certains métabolites intermédiaires produits par l'oxydation du glucose à la suite d'une perfusion de glucose enrichi en ^{13}C , en particulier le glutamate et la glutamine (voir chapitre I.2. pour une revue des techniques de détection). La Figure 53 rappelle le marquage des principaux métabolites du cycle de Krebs à partir du $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Le glutamate ne fait pas directement partie du cycle de Krebs, mais est marqué *via* l'échange avec l' α -cétoglutarate. La vitesse du cycle de Krebs est notée V_{tca} et la vitesse d'échange entre l' α -cétoglutarate et le glutamate est notée V_x . De même, la glutamine est synthétisée à partir du glutamate et sa vitesse de synthèse est notée V_{gln} . De nombreuses études ont été menées par spectroscopie RMN du ^{13}C *in vitro* ou *ex vivo* sur des extraits perchloriques, des cultures cellulaires ou des tranches de cerveau (pour revue [Bachelard-1993] [Cruz-1999]). En revanche, peu d'équipes ont mesuré des flux métaboliques par spectroscopie RMN *in vivo* et il est intéressant de voir quelles informations métaboliques ont pu être obtenues par cette approche chez l'animal et chez l'homme. Auparavant, les problèmes liés à la modélisation seront examinés rapidement.

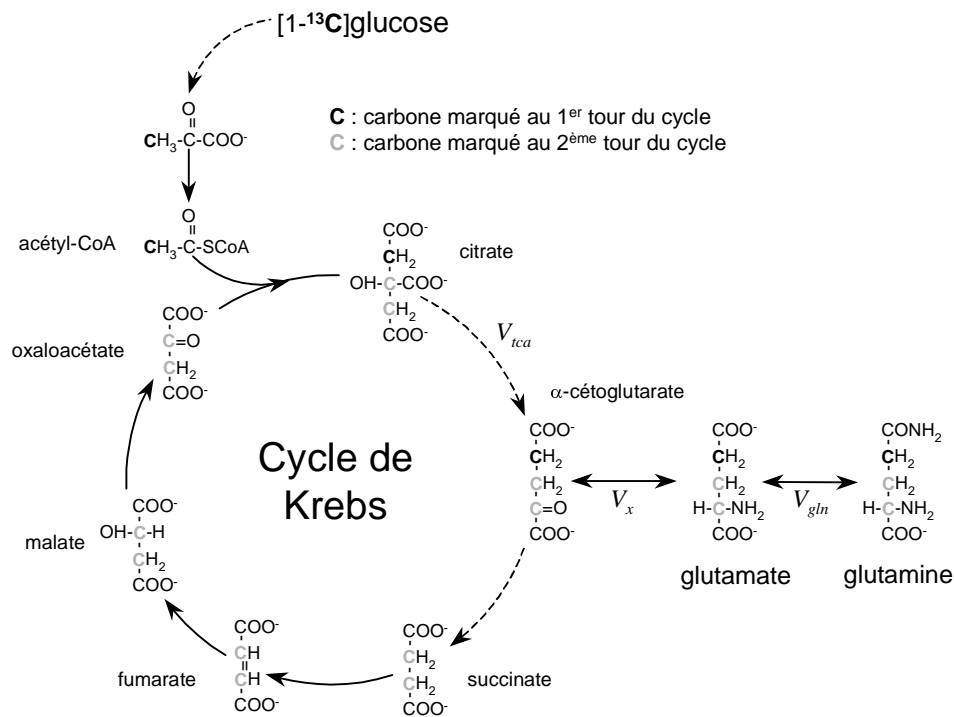


Figure 53. Marquage des métabolites liés au cycle de Krebs à partir de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Le glutamate est en échange avec l' α -cétoglutarate. Le glutamate C4 est marqué au premier tour du cycle de Krebs et le glutamate C2 et C3 au deuxième tour.

Modélisation

Les cinétiques de marquage mesurées par spectroscopie RMN ne mesurent pas directement les flux métaboliques mais plutôt des combinaisons des différents flux. Par exemple, la vitesse de marquage du glutamate dépend à la fois de la vitesse du cycle de Krebs et de la vitesse d'échange V_x entre l' α -cétoglutarate et le glutamate. Les valeurs de ces flux sont déterminées en ajustant aux cinétiques expérimentales un modèle mathématique qui rend compte de l'ensemble des réactions biochimiques mises en jeu dans le métabolisme. La modélisation est donc essentielle pour obtenir une information biochimique quantitative sur les flux métaboliques à partir des données RMN.

Cette modélisation se heurte à deux difficultés. La première difficulté, d'ordre méthodologique, est liée aux limitations de la spectroscopie RMN. En effet, la faible sensibilité de la technique ainsi que sa résolution spectrale limitée ne permettent pas de mesurer les cinétiques de marquage de l'ensemble des métabolites provenant du précurseur marqué. Ceci est particulièrement vrai *in vivo* où l'information se limite essentiellement aux cinétiques de marquage du glutamate et de la glutamine, dont la concentration dans le cerveau

est élevée. Même pour ces deux métabolites, la détection séparée et simultanée du marquage de chaque carbone C2, C3 et C4 est difficile. La plupart des études effectuées jusqu'à présent, aussi bien chez le rat que chez l'homme, se sont limitées aux cinétiques de marquage des carbones C3 et C4 du glutamate, ou bien du carbone C4 du glutamate et de la glutamine, ou même uniquement du glutamate C4 (voir plus bas les tableaux 1 et 2). Très récemment, les améliorations méthodologiques ont augmenté de manière significative la quantité d'information disponible en rendant possible la mesure simultanée du marquage des carbones C2, C3 et C4 du glutamate et de la glutamine, mais également de l'aspartate, du GABA et du lactate, chez l'homme à 4 T [Gruetter-1998a] et chez le rat à 9,4 T [Pfeuffer-1999a]. Le faible nombre de métabolites détectables *in vivo* oblige à élaborer un modèle simplifié du métabolisme en faisant un certain nombre d'hypothèses. Ces hypothèses, notamment sur les concentrations des différents métabolites, doivent s'appuyer sur des données obtenues par d'autres techniques [Mason-1992b], à partir par exemple d'études antérieures *in vitro*, et il peut alors subsister un doute sur leur validité *in vivo*.

La deuxième difficulté tient à la complexité du métabolisme cérébral. Le cerveau est composé de types cellulaires très différents. En particulier, les cellules neuronales et gliales possèdent des caractéristiques fonctionnelles très différentes et n'ont pas les mêmes caractéristiques métaboliques. De fait, de nombreuses expériences ont montré que le métabolisme cérébral comprend au moins deux compartiments, l'un neuronal et l'autre glial. Cette compartimentation métabolique est confirmée par la localisation exclusive de certaines enzymes dans l'un des deux compartiments. Par exemple, la glutamine synthase et la pyruvate carboxylase sont présentes uniquement dans les cellules gliales. La compartimentation du glutamate a été particulièrement étudiée. Selon un schéma largement accepté, le glutamate libéré par les terminaisons présynaptiques est rapidement recapté par les astrocytes et converti en glutamine. Cette dernière, inactive dans la neurotransmission, est alors retournée aux neurones et reconvertie en glutamate [Hertz-1999]. Selon ce schéma, la coopération étroite entre les neurones et les astrocytes établit un cycle glutamate-glutamine dont la vitesse serait directement proportionnelle à l'activité synaptique.

De même, Magistretti *et al.* ont suggéré que le glucose serait capté préférentiellement par les astrocytes à partir de la circulation sanguine [Magistretti-1996]. Le glucose serait dégradé en lactate dans les astrocytes avant d'être transféré vers les neurones. Ces deux exemples montrent que la compartimentation du métabolisme doit être prise en compte dans

la modélisation des cinétiques de marquage isotopique en considérant deux cycles de Krebs différents correspondant à chaque compartiment (Figure 54). Dans certains cas, cependant, les deux compartiments peuvent être modélisés par un seul compartiment. Par exemple, il a été montré que le pool de glutamate est principalement neuronal. Le pool de glutamate glial peut être négligé en première approximation.

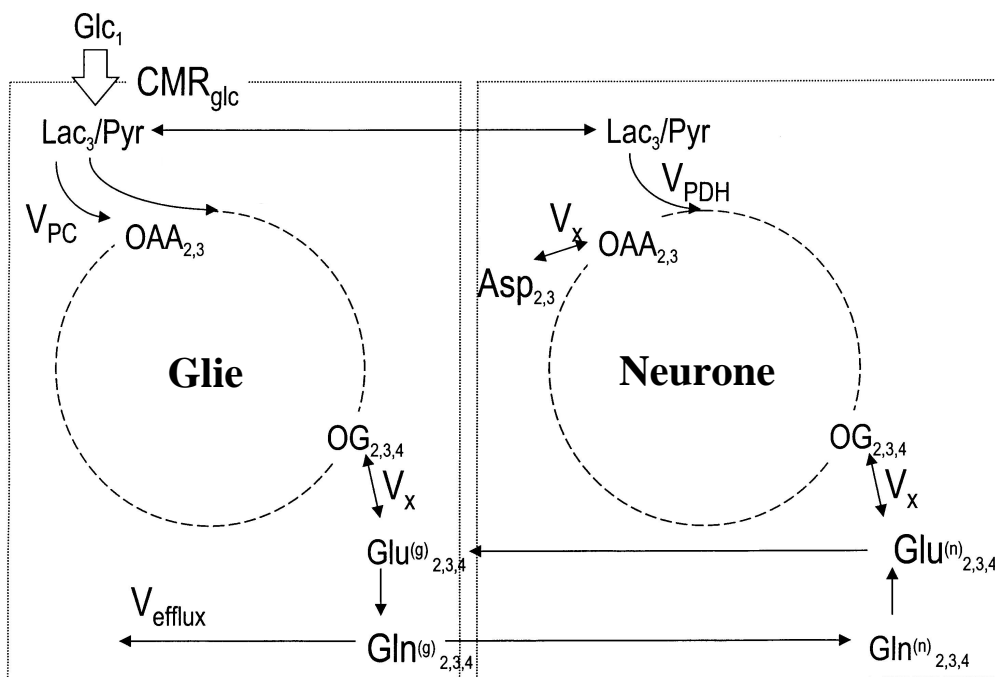


Figure 54. Modèle bicompartimental montrant le cycle de Krebs neuronal et le cycle de Krebs glial ainsi que le cycle glutamate-glutamine entre les neurones et la glie. Dans ce modèle, le glucose est capté et métabolisé préférentiellement par les astrocytes pour produire du lactate. Le lactate est alors utilisé par les neurones. Par ailleurs, le cycle glutamate-glutamine reflète l'activité synaptique glutamatergique. D'après [Gruetter-1998a]. Notations : OG =oxoglutarate= α -cétoglutarate, OAA =oxaloacétate, Glc =glucose, Glu =glutamate, Gln =glutamine, V_{PC} =flux à travers la pyruvate carboxylase, V_x =vitesse d'échange entre l' α -cétoglutarate et le glutamate, V_{efflux} =flux de glutamine sortant du cycle glutamate-glutamine.

Mesures de flux par spectroscopie RMN dans le cerveau *in vivo* chez le rat

Les études cinétiques effectuées *in vivo* sur le cerveau de rat sont résumées dans le Tableau 2.

Auteur	Anesthésie	B ₀	Détection	Cinétiques	Résultats modélisation
Mason 1992 (Fitzpatrick 1990)	N ₂ O	8,4T	POCE non localisé	glu C3, glu C4	$V_{tca}=1,58 \mu\text{mol/g/mn}$ $V_x \approx 100V_{tca}$
Hyder 1996	N ₂ O et α -chloralose	7T	POCE ISIS 50 μl	glu C4	$V_{tca}=0,49 \mu\text{mol/g/mn}$ contrôle $V_{tca}=1,48 \mu\text{mol/g/mn}$ activation
Hyder 1997	N ₂ O et α -chloralose (tubocurarine)	7T	POCE ISIS 24 μl [1,6- ¹³ C]glc	glu C4	$V_{tca}=0,47 \mu\text{mol/g/mn}$ contrôle $V_{tca}=1,44 \mu\text{mol/g/mn}$ activation
Hyder 1999	N ₂ O et morphine (tubocurarine)	7T	POCE CSI echoplanar [1,6- ¹³ C]glc	glu C4	Faisabilité carte de V_{tca} V_{tca} varie entre 0,5 et 1,2 $\mu\text{mol/g/mn}$
Sibson 1997	N ₂ O et α -chloralose	7T	¹³ C direct non localisé	glu C4, gln C4	Mesure de la vitesse du cycle glu-gln (V_{cycle}) $V_{tca}=0,46 \mu\text{mol/g/mn}$ contrôle $V_{tca}=0,57 \mu\text{mol/g/mn}$ hyperammonémie
Sibson 1998	Morphine ou α -chloralose ou pentobarbital	7T	¹³ C direct non localisé	glu C4, gln C4	Couplage stoechiométrique entre V_{tca} et V_{cycle} $V_{tca}=0,16 \mu\text{mol/g/mn}$ pentob. $V_{tca}=0,53 \mu\text{mol/g/mn}$ α -chlor. $V_{tca}=1,01 \mu\text{mol/g/mn}$ morphine

Tableau 2. Etudes du métabolisme oxydatif *in vivo* par spectroscopie RMN chez le rat. Les abréviations utilisées sont : glu=glutamate, gln=glutamine, POCE=Proton-Observed Carbon Edited, CSI=Chemical Shift Imaging

Les premières mesures *in vivo* dans le cerveau, effectuées chez le rat à 8,4 T, ont permis d'obtenir les cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 pendant une perfusion de glucose marqué. Ces données ont été utilisées pour calculer, à l'aide d'une modélisation, la vitesse du cycle de Krebs V_{tca} et la vitesse d'échange V_x entre l' α -cétoglutarate et le glutamate. [Fitzpatrick-1990] [Mason-1992b]. Ces données montrent notamment que V_{tca} est très inférieure à V_x . Les trois études réalisées plus tard par Hyder *et al.* chez le rat à 7 T ont mesuré uniquement la vitesse de marquage du glutamate C4 et en ont déduit V_{tca} en faisant l'hypothèse, fondée sur l'étude précédente, que V_x est très supérieure à V_{tca} . Il a ainsi été montré dans deux études que la vitesse du cycle de Krebs augmente fortement dans une région activée du cerveau pendant une stimulation sensorielle [Hyder-1996; Hyder-1997]. La troisième étude démontre la faisabilité d'associer l'imagerie de déplacement chimique avec les techniques echo-planar pour mesurer la vitesse du cycle de Krebs dans l'ensemble du cerveau

simultanément [Hyder-1999]. Tous ces travaux avaient pour but de mesurer essentiellement la vitesse du cycle de Krebs et ont utilisé un modèle à un seul compartiment métabolique. Au contraire, deux études réalisées chez le rat par Sibson *et al.* se sont concentrées sur la mesure *in vivo* du cycle glutamate-glutamine [Sibson-1997] [Sibson-1998a]. Pour mesurer la vitesse de ce cycle, Sibson *et al.* ont mesuré simultanément par spectroscopie ^{13}C directe la vitesse de marquage du glutamate C4 et de la glutamine C4. Le modèle utilisé était un modèle à deux compartiments métaboliques, l'un neuronal, l'autre glial. Selon cette étude, la majorité du flux à travers la glutamine synthase serait attribuable au cycle glutamate-glutamine et refléterait donc directement l'activité synaptique glutamatergique [Sibson-1997]. Par ailleurs, la vitesse du cycle de Krebs serait couplée de façon stoechiométrique à la vitesse du cycle glutamate-glutamine [Sibson-1997]. Autrement dit, selon les auteurs, la vitesse d'oxydation du glucose est proportionnelle à l'activité neuronale glutamatergique.

Mesures de flux par spectroscopie RMN dans le cerveau *in vivo* chez l'homme

Le Tableau 3 ci-dessous résume les études réalisées *in vivo* chez l'homme :

Auteur	B_0	Détection	Cinétiques	Résultats modélisation
Beckmann 1991	1,5T	^{13}C direct 1D-CSI	Glx C2, C3, C4	Pas de modélisation
Rothman 1992	2,1T	POCE ISIS 21 ml	Glu C4	Pas de modélisation
Mason 1995 (Gruetter 1994)	2,1T	^{13}C direct ISIS 144 ml	glu C3, C4 (gln C4, asp C3)	$V_{\text{tca}}=0,73 \mu\text{mol/g/mn}$ $V_x=57 \mu\text{mol/g/mn}$ $V_{\text{gln}}=0,47 \mu\text{mol/g/mn}$
Mason 1999	4,1T	POCE J-refocused CT 22,5 et 56 ml	glu C4	$V_{\text{tca}}=0,8 \mu\text{mol/g/mn}$ (m. grise) $V_{\text{tca}}=0,17 \mu\text{mol/g/mn}$ (m. blanche)
Shen 1999	2,1T	^{13}C direct HPT 144 ml	glu C4, gln C4	$V_{\text{tca}}=0,77 \mu\text{mol/g/mn}$ $V_{\text{gln}}=0,32 \mu\text{mol/g/mn}$
Gruetter 1998	4T	^{13}C direct HPT 72 ml	glu C2, C3, C4 gln C2, C3, C4 asp C2, C3 gaba C3, lac C3	Modélisation non encore publiée

Tableau 3. Etudes du métabolisme oxydatif *in vivo* par spectroscopie RMN chez l'homme. Les abréviations utilisées sont : glu=glutamate, gln=glutamine, glx=glutamate+glutamine, asp=aspartate, lac=lactate, HPT=Heteronuclear Polarization Transfer, POCE=Proton-Observed Carbon-Edited, CSI=Chemical Shift Imaging, J-refocused CT=J-refocused coherence transfer.

Les deux premières études de marquage réalisées, l'une en détection ^{13}C directe [Beckmann-1991], l'autre en POCE [Rothman-1992] n'ont pas été accompagnées d'une modélisation. La première étude de modélisation a été menée à partir des cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 et de la glutamine C4, obtenues par détection ^{13}C directe [Gruetter-1994]. La modélisation a permis de calculer la vitesse du cycle de Krebs, la vitesse d'échange α -cétoglutarate-glutamate et la vitesse de synthèse de la glutamine [Mason-1995]. Une autre étude, mesurant uniquement la cinétique de marquage du glutamate C4, a montré que la vitesse du cycle de Krebs est plus élevée dans la substance grise que dans la substance blanche [Mason-1999]. Shen *et al.* ont obtenu la première détermination de la vitesse du cycle glutamate-glutamine *in vivo* chez l'homme en mesurant les cinétiques de marquage du glutamate C4 et de la glutamine C4 et en modélisant les deux compartiments neuronal et glial [Shen-1999a]. Enfin, même si la modélisation complète n'a pas encore été publiée, Gruetter *et al.* ont démontré qu'il est possible de mesurer simultanément les cinétiques de marquage du glutamate (C2, C3 et C4), de la glutamine (C2, C3 et C4) et de l'aspartate (C2 et C3), ainsi que du GABA et du lactate avec un moins bon rapport signal-sur-bruit [Gruetter-1998a]. Ainsi, il devrait être possible de déterminer simultanément *in vivo* la consommation de glucose, l'activité glutamatergique *via* le cycle glutamate-glutamine, la vitesse du cycle de Krebs, le flux à travers la pyruvate carboxylase et la vitesse d'échange α -cétoglutarate-glutamate.

Ces études *in vivo* chez le rat et chez l'homme ont apporté des données précieuses pour éclairer les questions de neurophysiologie soulevées par les nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle (PET et IRMf). Une première question concerne la façon dont le cerveau produit l'énergie supplémentaire dans une région activée et l'origine du contraste BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) en IRM fonctionnelle [Barinaga-1997; Shulman-1999]. Chez l'homme éveillé, les mesures par spectroscopie RMN montrent que l'activité neuronale glutamatergique utiliserait 80% de l'énergie produite par l'oxydation du glucose dans le cerveau [Shen-1999a] [Shulman-1998]. Une deuxième question concerne le mécanisme de couplage entre l'activité neuronale et la production localisée d'énergie. Dans ce contexte, Pellerin et Magistretti ont proposé un mécanisme de couplage entre le cycle glutamate-glutamine et la glycolyse aérobie [Pellerin-1994]. En résumé, l'examen des études réalisées jusqu'ici par spectroscopie RMN *in vivo* montre d'une part qu'elle peut apporter des données qui ne peuvent être obtenues par aucune autre technique, d'autre part que les progrès récents

permettent d'acquérir plus d'informations métaboliques et ouvrent la voie à des modélisations moins simplifiées. Ces progrès peuvent être appliqués non seulement à l'étude du fonctionnement normal du cerveau, mais également à l'étude des nombreuses maladies dans lesquelles le métabolisme énergétique pourrait être perturbé.

Objectif de l'étude

Dans le modèle animal 3-NP, aussi bien après une intoxication aiguë que pendant une intoxication chronique, on observe une dénégérescence sélective du striatum alors que l'inhibition de la SDH causée par la toxine est non-sélective et agit dans tout le cerveau. Après l'injection d'une dose unique de 3-NP chez le rat (25 mg/kg ip), les mesures histochimiques montrent en effet que l'inhibition de la SDH atteint rapidement environ 50% dans tout le cerveau et se prolonge pendant près de 48h [Brouillet-1998]. La vulnérabilité sélective du striatum est au centre des questions concernant les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la neurodégérescence sur ce modèle animal, et probablement également dans la maladie de Huntington. Cependant, la mesure statique du taux d'inhibition de la SDH ne permet pas de savoir quel est l'effet de cette inhibition enzymatique sur le flux métabolique à travers l'enzyme, et plus généralement quelles en sont les conséquences sur l'ensemble du métabolisme oxydatif. On peut notamment se demander quel est l'effet d'une intoxication au 3-NP sur la vitesse du cycle de Krebs. Bien que l'injection aiguë de 3-NP soit très toxique et ne reproduise pas le développement progressif des lésions caractéristiques de la maladie de Huntington, elle a été préférée dans un premier temps au modèle chronique pour simplifier le protocole expérimental. L'intoxication chronique chez le rat nécessite en effet l'implantation d'une pompe osmotique sous-cutanée et un traitement pendant 3 à 5 jours. Le but de l'étude présentée dans ce chapitre a donc été de mesurer chez le rat après une intoxication aiguë au 3-NP la vitesse de marquage du glutamate C3 et C4 pendant une perfusion de [1-¹³C]glucose, et de calculer à partir de ces données la vitesse du cycle de Krebs.

II.3.2. Matériels et méthodes

Préparation des animaux

Deux groupes de rats mâles Sprague-Dawley ont été étudiés : un groupe contrôle (n=5; poids 324±29 g, moyenne±SD) et un groupe 3-NP (n=5; poids 303±57 g). Environ 16 heures avant l'expérience, les animaux ont été mis à jeun avec de l'eau à volonté et les animaux du groupe 3-NP ont reçu une dose unique de 3-NP (25 mg/kg ip). Le 3-NP était dissous dans de l'eau et le pH ajusté à 7,4 avec du NaOH. Le jour de l'expérience, les animaux ont été trachéotomisés sous isoflurane grâce à un masque puis intubés et ventilés mécaniquement (volume 2,5 ml, fréquence 65/minute) avec un mélange 30% O₂/70% N₂O. L'anesthésie gazeuse a été maintenue (isoflurane 3%) pendant toute la durée de la chirurgie. La veine fémorale et l'artère fémorale ont été cathétérisées (PE 50) pour permettre respectivement la perfusion de glucose et les prélèvements sanguins. Les animaux ont ensuite été placés dans un support construit au laboratoire, la tête étant maintenue par des barres d'oreilles et une barre à dents. La peau du crâne a été retirée pour minimiser la contamination lipidique et le crâne nettoyé de tous les tissus entre les crêtes temporales avec de l'eau oxygénée (30%). La sonde proton-carbone (proton Ø 1 cm, carbone Ø 3 cm) a été positionnée environ 2 mm en arrière du bregma et une lamelle de plastique a été insérée entre le crâne et l'antenne pour éviter que les liquides physiologiques ne perturbent les caractéristiques électriques de la sonde. L'anesthésie sous isoflurane a été alors arrêtée et remplacée par de l' α -chloralose ip (80 mg/kg puis 20 mg/kg toutes les 40 mn). La température rectale des animaux était mesurée par un thermocouple et maintenue à 38° C par de l'eau chaude circulant dans le support. Les gaz du sang étaient analysés régulièrement pour vérifier la bonne respiration des animaux. La glycémie à jeun a été mesurée avant le début de la perfusion de glucose.

Après les réglages pour la spectroscopie, la glycémie a été augmentée brusquement d'environ 1,5 g/l à 4,5 g/l par un bolus (0,35 ml/kg) de [1-¹³C]glucose à 20% (poids/volume) enrichi à 100% en ¹³C, suivi par une perfusion continue (1,02 ml/kg/heure) de [1-¹³C]glucose enrichi à 67% jusqu'à la fin de l'expérience. Le bolus a été perfusé de manière exponentielle sur 5 minutes. Ce protocole a été optimisé auparavant hors aimant pour obtenir un plateau hyperglycémique stable à environ 4,5 g/l (Figure 55) et un enrichissement du glucose plasmatique stable entre 60% et 65%.

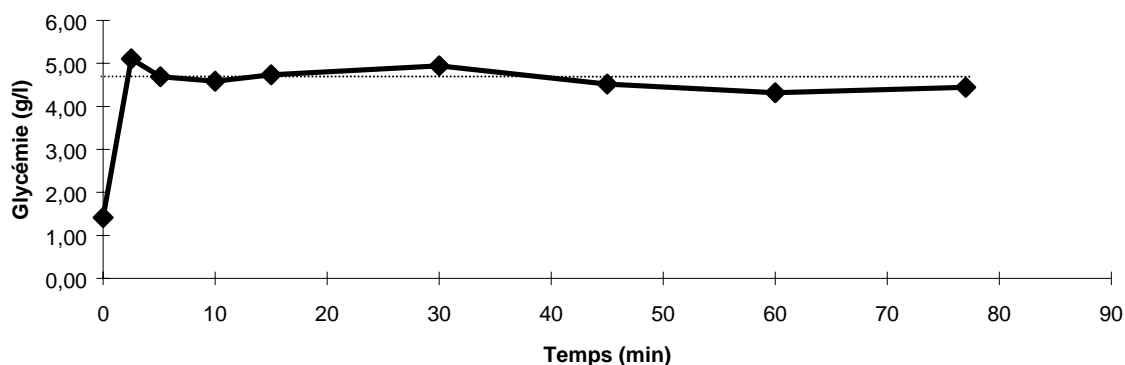


Figure 55. Exemple de glycémie mesurée au cours du temps pendant le protocole de perfusion de glucose utilisé pour réaliser un plateau hyperglycémique.

Après acquisition des cinétiques de marquage du glutamate par spectroscopie RMN, les animaux ont été sortis de l'aimant et décapités pour prélèvement du cerveau. Un hémisphère a été congelé immédiatement après prélèvement dans de l'azote liquide pour analyse en RMN haute résolution à 7 T, l'autre hémisphère a été congelé dans de l'isopentane à -25°C pour mesure histochimique du taux d'inhibition de la SDH.

Spectroscopie RMN in vivo

La séquence SPOCE (voir Chapitre I.2.) a été utilisée pour mesurer simultanément les cinétiques de marquage des carbones 3 et 4 du glutamate à partir du glucose. Pour les animaux du groupe contrôle, chaque point temporel a été acquis avec 128 répétitions (soit 32 répétitions pour chaque spectre individuel A, B, C et D de la méthode SPOCE) plus deux répétitions en début de spectre pour atteindre l'équilibre, soit une résolution temporelle de 5,5 minutes. Pour les animaux 3-NP, la concentration de succinate était susceptible d'augmenter fortement à cause de l'inhibition de la SDH. Ce pic de succinate à 2,4 ppm peut contaminer la mesure du glutamate C4 à 2,34 ppm. Avec la séquence SPOCE, le succinate marqué au ^{13}C sur les carbones 2 et 3 est coédité majoritairement avec le glutamate marqué sur le C4 car les fréquences des carbones sont très proches (35,0 ppm et 34,4 ppm respectivement). Par conséquent, pour les animaux du groupe 3-NP, deux spectres supplémentaires ont été acquis pour chaque point temporel de la cinétique en plus des quatre spectres de la séquence SPOCE afin de mesurer l'éventuel pic de succinate par POCE non sélectif. Ces deux spectres supplémentaires ont été acquis avec un temps d'écho de 45 ms. Ce temps d'écho a été optimisé par simulation pour annuler le signal de glutamate J-modulé dans l'écho de spin

(Figure 56) alors que le succinate, non couplé, reste sous la forme d'un singulet. Pour les animaux 3-NP, chaque point temporel a ainsi été acquis avec 144 répétitions (soit 24 répétitions pour chacun des 6 spectres) plus deux répétitions pour atteindre l'état d'équilibre, soit une résolution temporelle de 6,2 minutes.

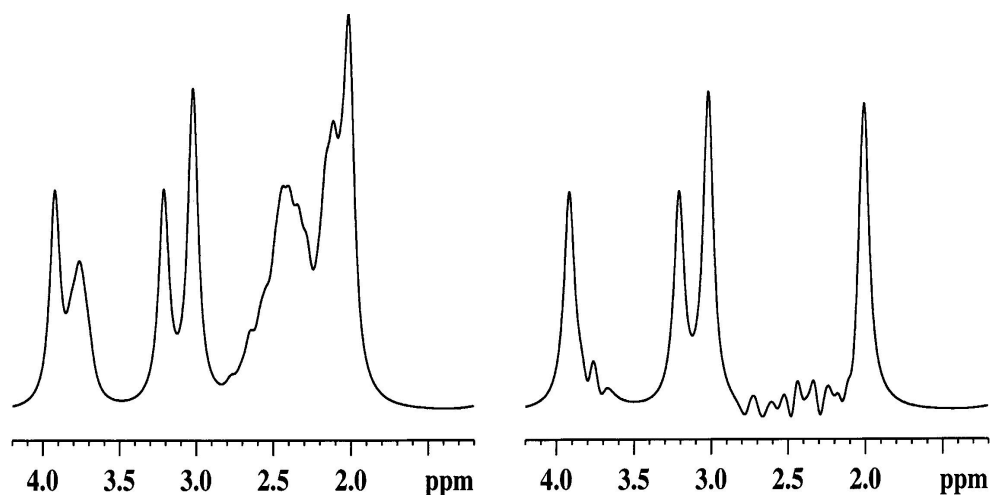


Figure 56. Simulation avec le logiciel Bruker NMRSIM[®] du spectre de la choline, de la créatine, du NAA, du glutamate et de la glutamine à temps d'écho (a) TE=10 ms et (b) TE=45 ms. Le temps d'écho en (b) a été choisi pour atténuer au maximum le signal du glutamate et de la glutamine par J-modulation et permettre la détection du singulet du succinate à 2,4 ppm. La largeur de raie simulée est de 10 Hz.

Spectroscopie RMN haute résolution

L'hémisphère prélevé pour la spectroscopie haute résolution a été broyé dans l'azote liquide puis dissous dans 7 ml d'acide perchlorique (0,1M) pour extraction des métabolites. Les échantillons ont ensuite neutralisés et centrifugés. Le surnageant a été lyophilisé et redissous dans du D₂O. Deux spectres avec et sans inversion ¹³C correspondant à l'édition POCE ont été acquis pour chaque échantillon.

Les concentrations des métabolites ont été mesurées par intégration par rapport au pic de créatine sur le spectre proton découplé sans inversion ¹³C, après une différence de convolution (facteur d'élargissement=30 Hz, facteur de soustraction=0,7) pour améliorer la ligne de base du spectre. Le pic de NAA a été intégré directement par rapport au pic de créatine. Le triplet du glutamate C4 a été intégré de la même façon. Ce triplet du glutamate est légèrement contaminé par le pic de succinate qui se superpose à une des raies latérales du triplet. La concentration du succinate a été estimée en comparant par soustraction le pic de succinate

avec le singulet de la créatine, et la concentration du glutamate C4 a été corrigée en retranchant la concentration de succinate. Enfin, la concentration de la glutamine a été calculée en intégrant le massif du glutamate et de la glutamine C3, et en soustrayant la concentration de glutamate de la valeur obtenue.

L'enrichissement du glutamate C4 sur le spectre édité par POCE a été déterminé en comparant directement par soustraction la résonance des satellites édités avec la résonance des protons $^{12}\text{C}+^{13}\text{C}$ du spectre avant édition. Pour cette mesure, il est nécessaire de corriger la largeur de raie du spectre avant édition (+ 1,5 Hz) car la largeur de raie des satellites du glutamate C4 est plus importante.

Modélisation

La Figure 57 décrit le modèle utilisé pour analyser les données cinétiques. Ce modèle comprend six pools métaboliques : lactate, α -cétoglutarate, glutamate, glutamine, succinate/OAA et aspartate. Chacun de ces pools correspond en réalité à un ensemble de métabolites en échange rapide les uns avec les autres. Par exemple, le pool de lactate L comprend l'ensemble des métabolites de la glycolyse entre le glucose et le lactate. De même, le pool succinate/OAA correspond à l'ensemble des métabolites du cycle de Krebs à l'exception de l' α -cétoglutarate.

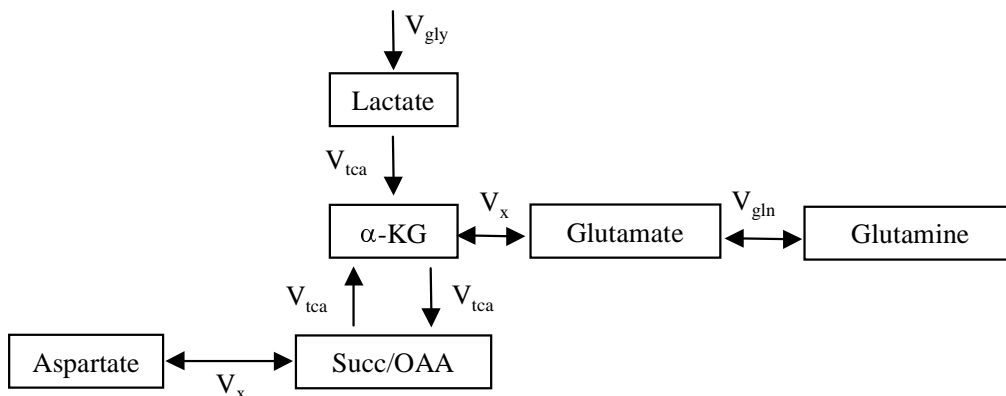


Figure 57. Modèle métabolique utilisé pour analyser les cinétiques de marquage des carbones C3 et C4 du glutamate. Ce modèle comprend six pools correspondant respectivement au lactate, à l' α -cétoglutarate (α -KG), au glutamate, à la glutamine, au succinate+oxaloacétate et à l'aspartate.

Les hypothèses du modèle sont les suivantes :

- Le système est à l'état stationnaire pendant toute la durée de l'expérience. Les concentrations des métabolites sont constantes ainsi que les vitesses de réaction.
- Le glucose intracérébral est en équilibre isotopique rapide avec le glucose plasmatique.
- La vitesse d'échange entre l'aspartate et l'oxaloacétate est identique à la vitesse d'échange entre l' α -cétoglutarate et le glutamate (V_x).
- L'enrichissement en ^{13}C du glucose plasmatique est supposé constant et égal à 60% pendant la durée de l'expérience.
- La dilution isotopique due notamment à l'entrée de lactate non marqué est supposée égale à 20% ([Mason-1999]). L'hypothèse précédente entraîne que l'enrichissement isotopique du lactate, noté E dans la suite, est constant et égal à 24%.
- la vitesse de synthèse de la glutamine à partir du glutamate est supposée égale à $0.46 \cdot V_{\text{tca}}$ ([Sibson-1997]).

Par ailleurs, les données expérimentales entrées dans le modèle sont :

- les concentrations des métabolites mesurées sur les extraits en haute résolution. Les concentrations du glutamate et de la glutamine sont mesurées directement sur le spectre proton par rapport à la créatine dont la concentration est supposée égale à 8 mM. Les concentrations des autres métabolites ne sont pas mesurables sur ces spectres et sont choisies d'après les premières modélisations effectuées en spectroscopie RMN [Mason-1992b] : $[\text{L}]=1$ mM, $[\alpha\text{KG}]=0.5$ mM, $[\text{OAA}]=1,1$ mM, $[\text{ASP}]=2$ mM.
- les cinétiques de marquage en ^{13}C des carbones 3 et 4 du glutamate mesurées *in vivo*. Ces cinétiques sont obtenues à partir des spectres en mesurant la hauteur des pics. Ces cinétiques en unités arbitraires doivent être normalisées pour correspondre aux concentrations de glutamate marqué. Pour cette normalisation, l'enrichissement du glutamate C4 (noté E_{GLUC4}) en fin de cinétique à $t=120$ mn est mesuré sur les extraits. Le facteur de normalisation est alors calculé en écrivant que la hauteur du pic de glutamate C4 en fin de cinétique (moyenne des deux derniers points de la cinétique) correspond à la concentration $E_{\text{GLUC4}} \times [\text{GLU}]$.

Tous les points des cinétiques C3 et C4 sont ensuite normalisés par le même facteur.

Pour chaque carbone de chaque métabolite, une équation différentielle décrit la conservation de l'isotope ^{13}C à travers le pool métabolique correspondant. Par exemple, pour la première équation traduisant la conservation du pool de lactate marqué sur le C3, la variation au cours du temps de la concentration de lactate marqué ($d[\text{L3}]/dt$) est égale à la différence entre la quantité de lactate marqué rentrant dans le pool (soit $E \cdot V_{\text{tca}}$) moins la quantité de lactate marqué sortant du pool (soit $V_{\text{tca}} \cdot [\text{L3}]/[\text{L}]$). En écrivant cette équation pour chaque pool, on obtient un système d'équations différentielles couplées représentant le modèle :

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{L3}]}{dt} &= V_{\text{tca}} \cdot \left(E - \frac{[\text{L3}]}{[\text{L}]} \right) \\ \frac{d[\alpha\text{KG4}]}{dt} &= V_{\text{tca}} \cdot \frac{[\text{L3}]}{[\text{L}]} + V_x \cdot \frac{[\text{GLU4}]}{[\text{GLU}]} - (V_{\text{tca}} + V_x) \cdot \frac{[\alpha\text{KG4}]}{[\alpha\text{KG}]} \\ \frac{d[\alpha\text{KG3}]}{dt} &= V_{\text{tca}} \cdot \frac{[\text{OAA2}]}{[\text{OAA}]} + V_x \cdot \frac{[\text{GLU3}]}{[\text{GLU}]} - (V_{\text{tca}} + V_x) \cdot \frac{[\alpha\text{KG3}]}{[\alpha\text{KG}]} \\ \frac{d[\text{GLU4}]}{dt} &= V_x \cdot \frac{[\alpha\text{KG4}]}{[\alpha\text{KG}]} - (V_x + V_{\text{gln}}) \cdot \frac{[\text{GLU4}]}{[\text{GLU}]} + V_{\text{gln}} \cdot \frac{[\text{GLN4}]}{[\text{GLN}]} \\ \frac{d[\text{GLU3}]}{dt} &= V_x \cdot \frac{[\alpha\text{KG3}]}{[\alpha\text{KG}]} - (V_x + V_{\text{gln}}) \cdot \frac{[\text{GLU3}]}{[\text{GLU}]} + V_{\text{gln}} \cdot \frac{[\text{GLN3}]}{[\text{GLN}]} \\ \frac{d[\text{OAA2}]}{dt} &= \frac{1}{2} V_{\text{tca}} \cdot \left(\frac{[\alpha\text{KG4}]}{[\alpha\text{KG}]} + \frac{[\alpha\text{KG3}]}{[\alpha\text{KG}]} \right) + V_x \cdot \frac{[\text{ASP2}]}{[\text{ASP}]} - (V_{\text{tca}} + V_x) \cdot \frac{[\text{OAA2}]}{[\text{OAA}]} \\ \frac{d[\text{ASP2}]}{dt} &= V_x \cdot \left(\frac{[\text{OAA2}]}{[\text{OAA}]} - \frac{[\text{ASP2}]}{[\text{ASP}]} \right) \\ \frac{d[\text{GLN4}]}{dt} &= V_{\text{gln}} \cdot \left(\frac{[\text{GLU4}]}{[\text{GLU}]} - \frac{[\text{GLN4}]}{[\text{GLN}]} \right) \\ \frac{d[\text{GLN3}]}{dt} &= V_{\text{gln}} \cdot \left(\frac{[\text{GLU3}]}{[\text{GLU}]} - \frac{[\text{GLN3}]}{[\text{GLN}]} \right) \end{aligned}$$

Dans ces équations, les concentrations des métabolites marqués au ^{13}C sur un carbone donné sont spécifiées par un chiffre. Ainsi, $[\text{L3}]$ désigne la concentration de lactate marqué au ^{13}C sur le carbone 3, alors que $[\text{L}]$ désigne la concentration totale de lactate. La résolution de

ce système d'équations différentielles a été effectuée avec le logiciel MATLAB 5.3 (fonction ode15s). Les paramètres V_{tca} et V_x ont été optimisés par un algorithme de moindres carrés non-linéaires pour ajuster les cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 fournies par le modèle aux données expérimentales.

II.3.3. Résultats

Etat physiologique des animaux

Tous les animaux ont présenté une acidose métabolique en fin d'expérience. Le pH immédiatement avant sacrifice était de $7,24 \pm 0,04$ pour le groupe contrôle et de $7,21 \pm 0,06$ pour le groupe 3-NP. La pression partielle en gaz carbonique dans le sang immédiatement avant sacrifice était de 48 ± 12 mmHg pour le groupe contrôle et de 53 ± 9 mmHg pour le groupe 3-NP. La glycémie immédiatement avant le début de la perfusion de glucose était de $1,3 \pm 0,1$ g/l pour le groupe contrôle et de $1,5 \pm 0,2$ pour le groupe 3-NP. La glycémie avant sacrifice était respectivement de $3,7 \pm 0,4$ g/l pour le groupe contrôle et $4,3 \pm 1,2$ g/l pour le groupe 3-NP.

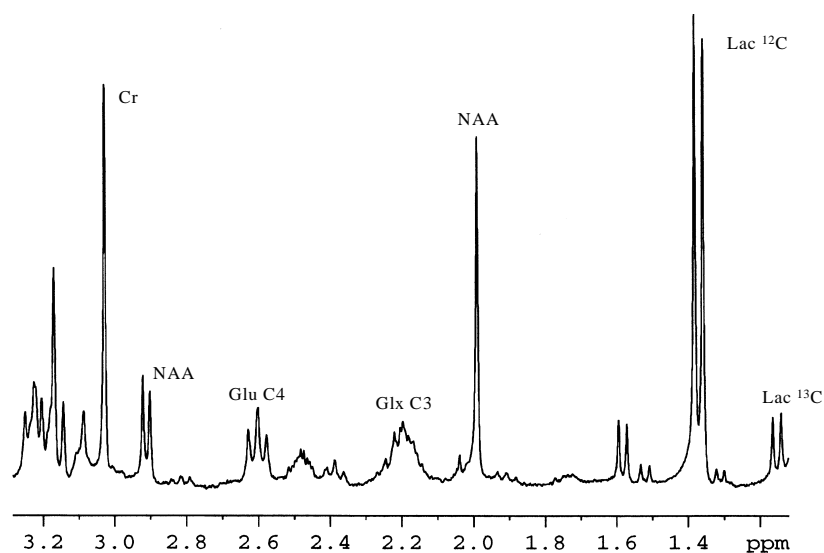


Figure 58. Spectre d'extrait perchlorique ($\text{pH}=1$) d'un hémisphère de cerveau de rat contrôle obtenu en haute résolution à 7 T sans découplage pendant l'acquisition. 16 répétitions, TR 15 s, élargissement lorentzien 1 Hz. Le cerveau a été prélevé après 120 mn de perfusion de glucose ^{13}C .

Concentrations *in vitro*

La Figure 58 montre un exemple de spectre proton obtenu sur extrait de cerveau, à partir duquel les concentrations des métabolites ont été mesurées.

	NAA	Glu	Gln	Succ
Groupe contrôle (n=5)	7,7±0,3 mM	9,6±1,3 mM	5,0±1,1 mM	0,36±0,12 mM
Groupe 3-NP (n=5)	6,7±0,5 mM (*)	8,5±0,5 mM	5,5±1,3 mM	0,42±0,06 mM

Tableau 4. Concentrations des principaux métabolites mesurées sur les spectres en haute résolution par rapport à la créatine. La concentration de NAA baisse de manière significative (*) dans le groupe 3-NP par rapport au groupe contrôle (test-t non apparié, $p=0,005$)

Les concentrations totales en NAA, glutamate, glutamine, et succinate par rapport à la créatine sont résumées dans le Tableau 4. On note une baisse significative de la concentration de NAA ($p=0,005$). La concentration de glutamate a tendance à baisser et celle de glutamine à monter, mais ces variations ne sont pas significatives. La concentration de succinate est inchangée entre les deux groupes.

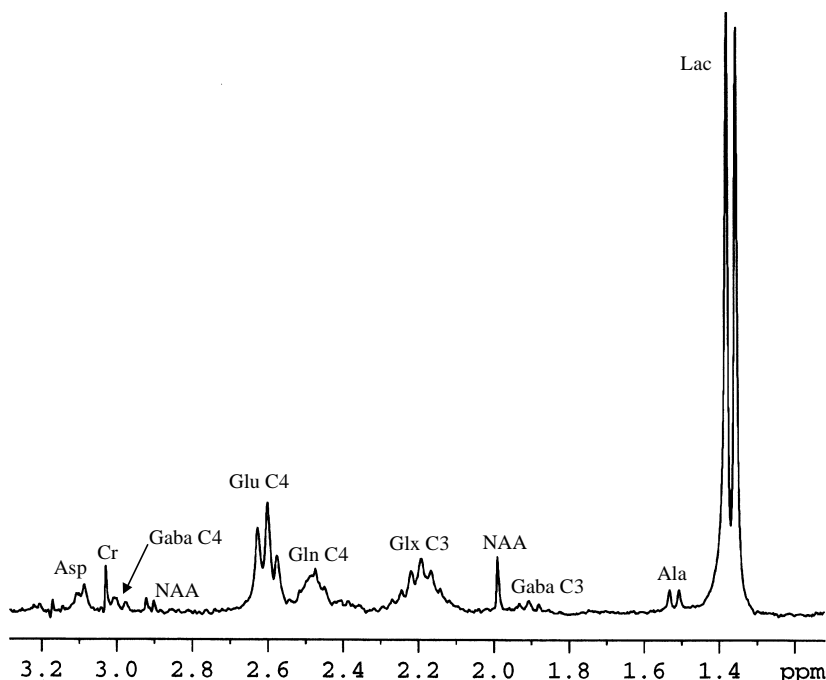


Figure 59. Détection des protons liés au ^{13}C par la technique POCE sur le même échantillon que celui de la Figure 58, avec découplage pendant l'acquisition. Les principaux métabolites marqués sont le glutamate, la glutamine, le lactate, l'alanine et l'aspartate. La créatine et le NAA sont visibles avec un enrichissement proche de l'abondance naturelle. 2x16 répétitions, TR 15 s, élargissement lorentzien 1 Hz.

Enrichissements in vitro à t=120 mn

L'enrichissement du glutamate C4 en fin d'expérience a été calculé à partir de spectres d'extrait de cerveau obtenus par la technique POCE (Figure 59).

Les enrichissements du glucose plasmatique et du glutamate C4 après 120 minutes de perfusion de glucose marqué sont donnés dans le Tableau 5. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes dans les deux groupes.

	Glucose plasma	Glutamate C4
Groupe contrôle (n=5)	63,4±2,2 %	22,3±1,4 %
Groupe 3-NP (n=5)	62,5±2,2 %	22,2±1,5 %

Tableau 5. Enrichissements en ^{13}C du glucose plasmatique et du glutamate C4 cérébral à t=120 minutes, mesurés par spectroscopie RMN haute résolution à 7 T.

Modélisation et calcul de V_{tca} et V_x

La Figure 60 montre un exemple d'ajustement du modèle aux cinétiques expérimentales de marquage du glutamate C3 et C4. Pour cette modélisation, les concentrations de glutamate et de glutamine ont été prises égales respectivement à 9,5 mM et 5,0 mM pour le groupe contrôle, et 8,5 mM et 5,5 mM pour le groupe 3-NP. Ces valeurs correspondent aux concentrations moyennes mesurées sur les extraits (Tableau 4). Les valeurs de V_{tca} et V_x calculées après modélisation pour le groupe contrôle et le groupe 3-NP sont données dans le Tableau 6.

	V_{tca}	V_x
Groupe contrôle (n=5)	0,65±0,05 $\mu\text{mol/g/mn}$	1,54±0,81 $\mu\text{mol/g/mn}$
Groupe 3-NP (n=5)	0,54±0,06 $\mu\text{mol/g/mn}$ (*)	2,83±2,18 $\mu\text{mol/g/mn}$

Tableau 6. Valeurs de V_{tca} et V_x obtenues par ajustement du modèle métabolique aux cinétiques expérimentales. La valeur de V_{tca} est significativement diminuée dans le groupe 3-NP (t-test non apparié, $p < 0,02$)

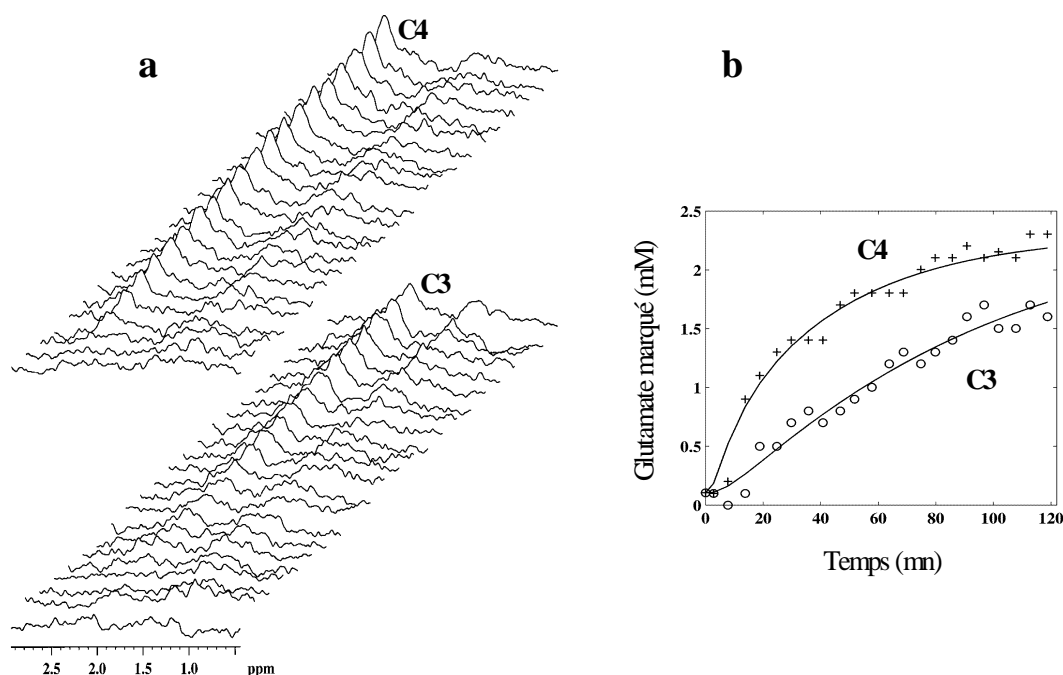


Figure 60. Exemple d'ajustement du modèle aux cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4. (a) Série de spectres montrant les cinétiques de marquage du glutamate C3 et C4 sur un rat contrôlé. (b) Les hauteurs des pics sont mesurées sur les spectres en (a) et le modèle est ajusté sur ces données pour déterminer les flux V_{tca} et V_x .

II.3.4. Discussion et conclusion

Les données que nous présentons dans cette étude constituent à notre connaissance les premières mesures de vitesse du cycle de Krebs effectuées *in vivo* dans un modèle de maladie neurodégénérative. Une vitesse du cycle de Krebs de $0,65 \pm 0,05 \mu\text{mol/g/mn}$ a été mesurée sur le groupe contrôle. Cette valeur est légèrement supérieure aux valeurs obtenues par Hyder *et al.* chez le rat anesthésié sous α -chloralose, soit $0,49 \mu\text{mol/g/mn}$ [Hyder-1996], mais inférieure à la valeur obtenue par Fitzpatrick *et al.* chez le rat anesthésié sous N_2O seul, soit $1,48 \text{ mmol/g/mn}$ [Fitzpatrick-1990]. Ceci n'est pas surprenant car il a été montré que les valeurs de V_{tca} dépendent beaucoup du protocole d'anesthésie utilisé [Sibson-1998b]. Par ailleurs, il faut souligner l'excellente reproductibilité des résultats : la valeur du cycle de Krebs a été déterminée avec une déviation standard de 10% environ dans chacun des deux groupes. La mesure séparée du glutamate C3 et C4 grâce à la technique SPOCE à 3 T permet donc de mesurer de manière fiable la vitesse du cycle de Krebs dans le cerveau. En revanche, la variabilité sur la mesure de V_x est importante. Ceci résulte du fait que lorsque V_x devient

supérieure à V_{tca} , la valeur de V_x influe peu sur la valeur de V_{tca} . Autrement dit, la valeur de V_x est mal déterminée par les données expérimentales.

L'étude que nous avons réalisée montre également que, 16 heures après l'injection d'une dose de 25 mg/kg de 3-NP, la vitesse du cycle de Krebs est réduite de 17% chez les animaux intoxiqués par rapport aux animaux contrôle. La mesure histochimique du taux d'inhibition de la SDH sur chaque cerveau n'a pas encore été effectuée. Il sera intéressant de comparer ce taux d'inhibition avec la diminution de 17% de la valeur de V_{tca} mesurée. Un certain nombre d'animaux intoxiqués au 3-NP n'ont pas survécu jusqu'à la fin de l'expérience. On peut donc se demander si les données obtenues sur le groupe 3-NP ne proviennent pas des animaux chez lesquels l'inhibition de la SDH est la moins élevée. Les mesures histochimiques sur les cerveaux prélevés en fin d'expérience permettront de savoir si l'inhibition de la SDH est en moyenne plus faible chez ces animaux que la valeur de 50% attendue d'après l'étude de Brouillet *et al.* [Brouillet-1998].

L'origine de l'acidose observée chez l'ensemble des animaux étudiés n'a pas été déterminée avec certitude. Il est cependant connu que l'anesthésie prolongée sous α -chloralose peut entraîner une acidose métabolique. Une acidose d'origine respiratoire due à une mauvaise ventilation n'a pas été observée lors d'expériences de mise au point hors aimant. Quoiqu'il en soit, l'acidose a été observée de manière similaire dans le groupe contrôle et dans le groupe 3-NP, ce qui exclut ce paramètre pour expliquer la différence de V_{tca} mesurée.

Parmi les métabolites mesurés sur les extraits, seul le NAA présente une baisse significative dans le groupe 3-NP. Cette baisse de la concentration de NAA est cohérente avec les études précédentes [Dautry-2000b]. La concentration de glutamate présente une tendance à la baisse et celle de glutamine une tendance à la hausse, mais ces variations ne sont pas significatives en raison de la plus grande variabilité de concentration observée pour ces métabolites. En revanche, de manière surprenante, nous n'avons pas noté d'augmentation significative du pic de succinate chez les animaux intoxiqués au 3-NP, 16 heures après l'injection, malgré la présence de symptômes moteurs et parfois de lésions visibles sur les images pondérées en T_1 (Figure 61). Cette stabilité du succinate contraste avec l'observation que la concentration de succinate augmente fortement dans les heures qui suivent une intoxication par voie intraveineuse [Lee-2000]. Nous avons également noté cette hausse du succinate *in vivo* par RMN dans les heures suivant une intoxication par voie ip (données non

montrées). Il est donc vraisemblable que la hausse de la concentration de succinate après une injection de 3-NP soit seulement transitoire et réversible.

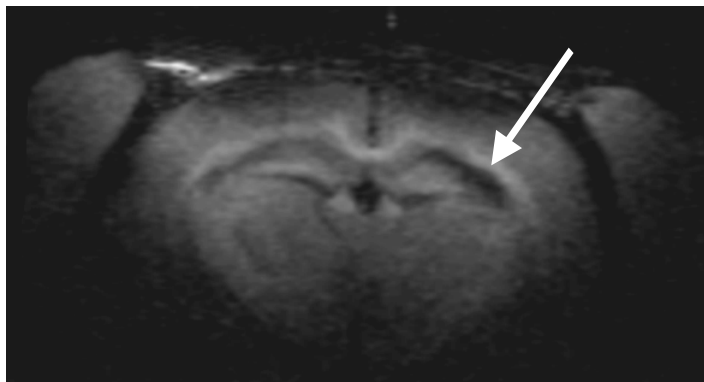


Figure 61. Image RMN pondérée en T_1 du cerveau d'un rat 16 heures après injection de 25 mg/kg de 3-NP. Une lésion dorsale latérale du striatum caractéristique de l'effet du 3-NP est visible sur l'image (flèche).

La connaissance des concentrations des principaux métabolites revêt une importance cruciale pour la modélisation des cinétiques de marquage. En effet, un pool métabolique de forte concentration a un effet tampon qui ralentit la vitesse de marquage des métabolites situés en aval de ce pool. Par ailleurs, la concentration de certains métabolites ne peut pas être déterminée avec précision, même sur les extraits en spectroscopie haute-résolution (par exemple l' α -cétoglutarate). Les conséquences de cette incertitude sur la modélisation doivent être évaluées en vérifiant qu'une modification des hypothèses n'influe pas de manière importante sur les valeurs de V_{tca} calculées.

Les mesures de glycémie montrent par ailleurs que la glycémie des animaux 3-NP a tendance à être un peu plus élevée que chez les animaux contrôle, aussi bien avant le début de la perfusion de glucose qu'en fin de perfusion. Cependant, les mesures de plateau hyperglycémique et d'enrichissement du glucose plasmatique au cours du temps effectuées sur de nombreux animaux hors aimant n'ont pas montré de différence significative avec et sans intoxication au 3-NP (données non montrées). De même, les enrichissements en ^{13}C du glucose plasmatique mesurés sur les animaux après l'acquisition des cinétiques de marquage du glutamate *in vivo* ne sont pas significativement différents entre le groupe contrôle et le groupe 3-NP (Tableau 5). La conséquence d'une incertitude sur la cinétique d'enrichissement en ^{13}C du glucose plasmatique (idéalement rectangulaire) devra cependant être évaluée dans le modèle.

Plusieurs prolongements de l'étude peuvent être envisagés. Tout d'abord, il serait souhaitable d'effectuer les mêmes mesures après une intoxication chronique au 3-NP, qui donne des lésions plus proches de celles observées dans la maladie de Huntington que l'injection aiguë. Deuxièmement, le volume de détection pourrait être réduit pour mesurer les cinétiques de marquage séparément dans le cortex et dans le striatum, de manière à mettre en évidence des éléments qui pourraient expliquer la vulnérabilité préférentielle du striatum. La perte de sensibilité provoquée par la réduction du volume de détection pourrait être compensée par la perfusion de glucose doublement marqué, et le signal provenant des deux régions pourraient être acquis simultanément par encodage Hadamard. On peut se demander si la vitesse du cycle de Krebs chez l'animal normal est la même dans les deux régions. Une vitesse du cycle de Krebs plus élevée dans le striatum que dans le cortex pourrait en effet apporter une explication à la plus grande vulnérabilité du striatum à un déficit énergétique. Enfin, après ces expériences chez le rat, les mesures de cycle de Krebs pendant une intoxication chronique pourraient être mises en œuvre chez le singe chez lequel des symptômes plus proches que chez le rat de la maladie de Huntington humaine peuvent être reproduits.

Conclusion générale

Le but de ce travail de thèse était de développer la spectroscopie RMN du cerveau *in vivo* sur l'aimant à 3 T du Service Hospitalier Frédéric Joliot pour étudier des modèles animaux (rat et primate) de maladies neurodégénératives. Au début de cette thèse, en 1997, les travaux du laboratoire en spectroscopie RMN portaient uniquement sur le muscle squelettique et la spectroscopie du cerveau était inexistante. Il a donc fallu créer de nouveaux outils et résoudre les problèmes spécifiques liés à la spectroscopie du cerveau. Les premiers efforts ont porté notamment sur l'optimisation de l'homogénéité du champ magnétique, la stabilité des spectres nécessaire pour la spectroscopie différentielle ou encore la qualité de la localisation. La méthode FASTMAP a été mise en œuvre pour optimiser automatiquement l'homogénéité du champ magnétique. L'acquisition entrelacée des spectres en utilisant le mécanisme de "pipeline filter" de Bruker a permis d'améliorer la stabilité de la spectroscopie différentielle. Par la suite, trois développements méthodologiques originaux ont été proposés et publiés. Tout d'abord, l'utilisation de FASTMAP a entraîné une dérive de la fréquence de l'aimant et une méthode de correction en temps réel de la fréquence a été développée pour corriger cette dérive. Bien que cette méthode ait été mise en œuvre initialement pour corriger un défaut de l'aimant du SHFJ, l'amélioration constante de la résolution spectrale en spectroscopie RMN devrait la rendre utile pour des dérives de fréquence comprises dans les limites des spécifications des aimants à très haut champ. Ensuite, une nouvelle technique appelée SPOCE (Semiselective Proton-Observed Carbon-Edited) a été développée pour détecter séparément à 3 T les résonances des protons du glutamate C3 et C4 couplés au ^{13}C alors que ces résonances se superposent sur le spectre. Plus généralement, cette technique permet de séparer deux résonances non résolues de protons couplés au ^{13}C à condition que les fréquences des carbones couplés soient différentes. La nouvelle séquence a été analysée en détail et utilisée avec succès pour mesurer les cinétiques de marquage de glutamate C3 et C4 à partir de glucose marqué sur le cerveau de rat à 3 T. Enfin, une nouvelle méthode a été proposée pour mesurer directement la résonance du GABA à 3,0 ppm sans contamination par la résonance des macromolécules. Cette méthode apporte un gain de temps d'acquisition et un gain de précision de mesure. Une étude préliminaire effectuée chez le babouin n'a pas permis de

détecter de variation de la concentration striatale de GABA lors d'une intoxication chronique au 3-NP (non montré). D'autres mesures seront nécessaires pour confirmer cette observation.

Ces développements méthodologiques permettent aujourd'hui d'envisager au SHFJ de nombreuses applications dans le domaine de la physiologie et de la physiopathologie cérébrales. Dans ce cadre, la collaboration avec l'URA CEA-CNRS 2210 dirigée par P. Hantraye et spécialisée dans l'étude des maladies neurodégénératives est particulièrement motivante. Plusieurs protocoles ont déjà été mis en œuvre depuis environ un an pour étudier le modèle animal 3-NP de la maladie de Huntington. Des mesures par spectroscopie RMN chez le singe *in vivo* et chez le rat *ex vivo* ont permis de montrer que le N-acétyl-aspartate (NAA) est un marqueur réversible de dysfonctionnement neuronal dans ce modèle. Par ailleurs, les éventuels effets neuroprotecteurs d'une supplémentation en créatine ont été recherchés chez l'animal traité au 3-NP et un effet aggravant de la créatine a pu être mis en évidence à certaines doses. Cela n'élimine pas la possibilité d'un effet neuroprotecteur de la créatine, mais suggère que l'ajustement de la dose administrée est capital. Enfin, la détection du marquage isotopique du glutamate C3 et C4 pendant une perfusion de [1-¹³C]glucose en utilisant la méthode SPOCE a permis de montrer que la vitesse du cycle de Krebs est significativement diminuée 16 heures après une injection aiguë de 3-NP chez le rat. Il s'agit à notre connaissance de la première mesure de flux métabolique par spectroscopie RMN *in vivo* dans un modèle de maladie neurodégénérative.

L'application de la spectroscopie RMN *in vivo* à l'étude du cerveau au SHFJ n'en est qu'à ses débuts. Les études envisagées pour l'avenir peuvent être réparties en deux catégories : d'une part, la quantification de métabolites en spectroscopie proton, d'autre part les mesures de flux métaboliques par marquage isotopique. La spectroscopie proton permet aujourd'hui d'obtenir en routine à temps d'écho long les concentrations de choline, créatine, NAA et lactate dans le cortex et dans le striatum chez le singe et chez le rat. Pour profiter de la richesse d'information présente dans le spectre proton, il faut développer la quantification à temps d'écho court en utilisant des techniques d'analyse automatique du spectre. L'approche LCModel, qui utilise l'information a priori contenue dans des spectres de référence acquis *in vitro* pour chaque métabolite, paraît particulièrement prometteuse [Provencher-1993]. Il devrait être ainsi possible de mesurer notamment les concentrations de glutamate, de glutamine, de taurine et de myo-inositol. L'étude de patients atteints de la maladie de Huntington, bien que difficile à cause de mouvements involontaires provoqués par cette

maladie, est également envisagée. Le deuxième type d'études est constitué par les mesures *in vivo* de flux métaboliques par marquage isotopique pendant la perfusion d'un précurseur marqué. Il s'agit d'une technique encore relativement peu utilisée *in vivo* à cause de sa complexité et de son coût élevé. Dans le cadre des maladies neurodégénératives, l'étude du métabolisme énergétique par cette approche est très prometteuse car plusieurs de ces maladies pourraient être dues à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique [Beal-2000]. La première étude que nous avons réalisée chez le rat après intoxication aiguë au 3-NP peut être poursuivie, d'une part en effectuant une mesure plus localisée séparant les effets de l'intoxication dans le cortex et le striatum, d'autre part en utilisant un modèle d'intoxication chronique qui reproduit mieux les caractéristiques neuropathologiques de la maladie de Huntington. Par ailleurs, bien que le glucose soit généralement considéré comme le seul substrat énergétique du cerveau, d'autres précurseurs marqués au ^{13}C commencent à être utilisés pour étudier le métabolisme oxydatif cérébral. L'utilisation de précurseurs différents du glucose ouvre des perspectives pour l'étude de la compartimentation du métabolisme. En effet, alors que le glucose peut être métabolisé par les deux compartiments neuronal et glial, certains précurseurs ne rentrent que dans un seul compartiment. Par exemple, l'acétate est métabolisé uniquement par les astrocytes [Cerdan-1990] [Waniewski-1998], alors que le lactate semble capté uniquement par les neurones [Bouzier-2000]. Le fait d'avoir un précurseur spécifique d'un des deux compartiments simplifie la modélisation et l'interprétation des résultats. Il devient possible d'étudier *in vivo* par spectroscopie RMN dans quelle mesure la compartimentation du métabolisme est perturbée dans ces états pathologiques. Par exemple, on peut se demander si l'intoxication au 3-NP a des effets différents sur les compartiments neuronal et glial.

En conclusion, la mesure des concentrations de métabolites et des vitesses de réaction biochimiques par spectroscopie RMN apporte des données précieuses pour la compréhension du fonctionnement du cerveau. Les développements méthodologiques réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans la continuité des progrès constants réalisés depuis 20 ans en spectroscopie RMN. Ils permettent également de disposer au SHFJ d'outils de mesure performants pour l'acquisition de données biochimiques *in vivo* chez le rat et chez le singe. Ces données sont d'autant plus utiles qu'elles sont complétées par des études réalisées *post-mortem*, soit par spectroscopie RMN sur des extraits de cerveau, soit par des techniques immunochimiques ou immunohistochimiques. Il est possible de cette manière de relier les

mesures de suivi longitudinal ou les mesures cinétiques obtenues *in vivo* avec des informations plus fines obtenues *in vitro*. Ainsi, compte tenu des progrès accomplis ces dernières années, la spectroscopie RMN devrait s'imposer comme une technique de référence pour l'étude du métabolisme cérébral.

Publications

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

Articles

Henry, P.-G., Van de Moortele, P.-F., Giacomini, E., Nauerth, A. and Bloch, G. (1999). Field-frequency locked in vivo proton MRS on a whole-body spectrometer. *Magnetic Resonance in Medicine* 42(4):636-642.

Henry, P.-G., Roussel, R., Vaufrey, F., Dautry, C. and Bloch, G. (2000). Semiselective POCE NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 44(3):395-400.

Henry, P.-G., Dautry C., Hantraye P. and Bloch G. (2000). Brain GABA editing without macromolecule contamination. *Magnetic Resonance in Medicine* (in press).

Dautry, C., Vaufrey, F., Brouillet, E., Bizat, N., Henry, P.-G., Condé, F., Bloch, G. and Hantraye, P. (2000). Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal death in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:789-799.

Communications orales et posters

Henry, P.-G., Van de Moortele, P.-F., Giacomini, E., Nauerth, A. and Bloch, G. (1999). Field-frequency locked in vivo proton MRS on a whole-body spectrometer. *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, p.643. Philadelphie. Communication orale.

Henry, P.-G., Dautry C., Hantraye P. and Bloch G. (1999). Brain GABA editing without macromolecule contamination. *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, p.1581. Philadelphie. Poster.

Henry, P.-G., Roussel, R., Vaufrey, F., Dautry, C. and Bloch, G. (2000). Semiselective POCE NMR spectroscopy. *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, p. Denver. Communication orale.

Références bibliographiques

Artemov, D., Bhujwala, Z. M. and Glickson, J. D. (1995). In vivo selective measurement of {1-¹³C}-glucose metabolism in tumors by heteronuclear cross polarization. *Magnetic Resonance in Medicine* 33:151-155.

Bachelard, H. and Badar-Goffer, R. (1993). NMR spectroscopy in neurochemistry. *Journal of Neurochemistry* 61(2):412-429.

Barinaga, M. (1997). What makes brain neurons run? *Science* 276(5310):196-198.

Beal, M. F. (2000). Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends in Neuroscience* 23(7):298-304.

Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R. and Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal of Neuroscience* 13(10):4181-4192.

Beckmann, N., Turkalj, I., Seelig, J. and Keller, U. (1991). ¹³C NMR for the assessment of human brain glucose metabolism in vivo. *Biochemistry* 30(30):6362-6366.

Behar, K. L. and Ogino, T. (1993). Characterization of macromolecule resonances in the ¹H NMR spectrum of rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine* 30:38-44.

Behar, K. L., Petroff, O. A. C., Prichard, J. W., Alger, J. R. and Shulman, R. G. (1986). Detection of metabolites in rabbit brain by ¹³C NMR spectroscopy following administration of [1-¹³C]Glucose. *Magnetic Resonance in Medicine* 3:911-920.

Behar, K. L., Rothman, D. L., Spencer, D. D. and Petroff, O. A. C. (1994). Analysis of macromolecule resonances in ¹H NMR spectra of human brain. *Magnetic Resonance in Medicine* 32:294-302.

Bittoun, J. (1987). Un simulateur numérique d'imagerie par résonance nucléaire : conception et applications. Thèse de doctorat, Orsay.

Bomsdorf, H., Roschmann, P. and Wieland, J. (1991). Sensitivity enhancement in whole-body natural abundance ¹³C spectroscopy using ¹³C/¹H double-resonance techniques at 4 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine* 22:10-22.

Bottomley, P. A. (1987). Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 508:333-348.

Bottomley, P. A., Hardy, C. J., Roemer, P. B. and Mueller, O. M. (1989). Proton-decoupled, Overhauser-enhanced, spatially localized carbon-13 spectroscopy in humans. *Magnetic Resonance in Medicine* 12:348-363.

Bouzier, A. K., Thiaudiere, E., Biran, M., Rouland, R., Canioni, P. and Merle, M. (2000). The metabolism of [3-(13)C]lactate in the rat brain is specific of a pyruvate carboxylase-deprived compartment. *Journal of Neurochemistry* 75(2):480-486.

Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. F. and Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology* 59:427-468.

Brouillet, E., Guyot, M.-C., Mittoux, V., Altairac, S., Condé, F., Palfi, S. and Hantraye, P. (1998). Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *Journal of Neurochemistry* 70(2):794-805.

Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R. J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N. W. and Beal, M. F. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92(15):7105-7109.

Burum, D. P. and Ernst, R. R. (1980). Net polarization transfer via a J-ordered state for signal enhancement of low-sensitivity nuclei. *Journal of Magnetic Resonance* 39:163-168.

Cerdan, S., Kunnecke, B. and Seelig, J. (1990). Cerebral metabolism of [1,2-13C2]acetate as detected by in vivo and in vitro 13C NMR. *Journal of Biological Chemistry* 265(22):12916-12926.

Chen, W., Adriany, G., Zhu, X.-H., Gruetter, R. and Ugurbil, K. (1998). Detecting natural abundance carbon signal of NAA metabolite within 12-cm³ localized volume of human brain ¹H-¹³C NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 40:180-184.

Chmurny, G. N. and Hout, D. I. (1990). The ancient and honourable art of shimming. *Concepts in Magnetic Resonance* 2:131-149.

Choi, I.-Y. and Gruetter, R. (2000). Dynamic detection of NAA/GSH turnover: a 3D-localized in vivo ¹³C NMR study of rat brain. *Proceedings of the ISMRM, Denver* p.598.

Cruz, F. and Cerdan, S. (1999). Quantitative 13C NMR studies of metabolic compartmentation in the adult mammalian brain. *NMR in Biomedicine* 12(7):451-462.

Dautry, C. (2000a). Spectroscopie RMN du proton appliquée à l'étude des processus neurodégénératifs impliqués dans des modèles animaux de la maladie de Huntington. Thèse de doctorat, Paris.

Dautry, C., Conde, F., Brouillet, E., Mittoux, V., Beal, M. F., Bloch, G. and Hantraye, P. (1999). Serial 1H-NMR spectroscopy study of metabolic impairment in primates chronically treated with the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. *Neurobiology of Disease* 6(4):259-268.

Dautry, C., Vaufrey, F., Brouillet, E., Bizat, N., Henry, P.-G., Condé, F., Bloch, G. and Hantraye, P. (2000b). Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal death in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:789-799.

- de Graaf, R. A. and Nicolay, K. (1998).** Adiabatic water suppression using frequency-selective excitation. *Magnetic Resonance in Medicine* 40:690-696.
- Dechent, P., Pouwels, P. J., Wilken, B., Hanefeld, F. and Frahm, J. (1999).** Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *American Journal of Physiology* 277(3 Pt 2):R698-704.
- den Hollander, J. A. and Buchthal, S. D. (1997).** Observation of GABA at 1.5 Tesla in the human brain using J-resolved localized ^1H -NMR spectroscopy. *Proceedings of the ISMRM, Vancouver* p.1353.
- Doddrell, D. M., Pegg, D. T. and Bendall, M. R. (1982).** Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer. *Journal of Magnetic Resonance* 48:323-327.
- Ernst, T., Kreis, R. and Ross, B. D. (1993a).** Absolute quantitation of water and metabolites in the human brain. I. Compartments and water. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 102:1-8.
- Ernst, T., Kreis, R. and Ross, B. D. (1993b).** Absolute quantitation of water and metabolites in the human brain. II. Metabolite concentrations. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 102:9-19.
- Felblinger, J., Kreis, R. and Boesch, C. (1998).** Effects of physiologic motion of the human brain upon quantitative ^1H -MRS: analysis and correction by retro-gating. *NMR in Biomedicine* 11:107-114.
- Ferrante, R. J., Andreassen, O. A., Jenkins, B. G., Dedeoglu, A., Kuemmerle, S., Kubilus, J. K., Kaddurah-Daouk, R., Hersch, S. M. and Beal, M. F. (2000).** Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience* 20(12):4389-4397.
- Fitzpatrick, S. M., Hetherington, H. P., Behar, K. L. and Shulman, R. G. (1990).** The flux from glucose to glutamate in the rat brain in vivo as determined by ^1H -observed, ^{13}C -edited NMR spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 10:170-179.
- Foo, T. K. and King, K. F. (1999).** A computationally efficient method for tracking reference position displacements for motion compensation in magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* 42(3):548-553.
- Frahm, J., Merboldt, K.-D. and Hänicke, W. (1987).** Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. *Journal of Magnetic Resonance* 72:502-508.
- Gruetter, R. (1993).** Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first-order and second-order shim coils. *Magnetic Resonance in Medicine* 29:804-811.
- Gruetter, R., Adriany, G., Merkle, H. and Andersen, P. M. (1996).** Broadband decoupled, ^1H -localized ^{13}C MRS of the human brain at 4 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine* 36:659-664.
- Gruetter, R., Novotny, E. J., Boulware, S. D., Mason, G. F., Rothman, D. L., Shulman, G. I., Prichard, J. W. and Shulman, R. G. (1994).** Localized ^{13}C NMR spectroscopy in the

human brain of amino acid labeling from D-[1-¹³C]glucose. *Journal of Neurochemistry* 63:1377-1385.

Gruetter, R., Novotny, E. J., Boulware, S. D., Rothman, D. L., Mason, G., Shulman, G. I., Shulman, R. G. and Tamborlane, W. V. (1992a). Direct measurement of brain glucose concentration in humans by ¹³C NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:1109-1112.

Gruetter, R., Rothman, D. L., Novotny, E. J. and Shulman, R. G. (1992b). Localized ¹³C NMR spectroscopy of myo-inositol in the human brain in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine* 25(1):204-210.

Gruetter, R., Seaquist, E. R., Kim, S. and Ugurbil, K. (1998a). Localized in vivo ¹³C-NMR of glutamate metabolism in the human brain: initial results at 4 Tesla. *Developmental Neuroscience* 20:380-388.

Gruetter, R. and Tkac, I. (2000). Field mapping without reference scan using asymmetric echo-planar techniques. *Magnetic Resonance in Medicine* 43:319-323.

Gruetter, R., Ugurbil, K. and Seaquist, E. R. (1998b). Steady-state cerebral glucose concentrations and transport in the human brain. *Journal of Neurochemistry* 70:397-408.

Gruetter, R., Weisdorf, S. A., Rajanayagan, V., Terpstra, M., Merkle, H., Truwit, C. L., Garwood, M., Nyberg, S. L. and Ugurbil, K. (1998c). Resolution improvements in *in vivo* ¹H NMR spectra with increased magnetic field strength. *Journal of Magnetic Resonance* 135(1):260-264.

Haase, A., Frahm, J., Hanicke, W. and Matthaei, D. (1985). ¹H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in Medicine and Biology* 30(4):341-344.

Henriksen, O. (1995). In vivo quantitation of metabolite concentrations in the brain by means of proton MRS. *NMR in Biomedicine* 8(4):139-148.

Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. and Robinson, S. R. (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research* 57(4):417-428.

Hetherington, H. P., Newcomer, B. R. and Pan, J. W. (1998). Measurements of human cerebral GABA at 4.1 T using numerically optimized editing pulses. *Magnetic Resonance in Medicine* 39:6-10.

Hetherington, H. P. and Rothman, D. L. (1985). Phase cycling of composite refocusing pulses to eliminate dispersive refocusing magnetization. *Journal of Magnetic Resonance* 65:348-354.

Holshouser, B. A., Komu, M., Moller, H. E., Zijlmans, J., Kolem, H., Hinshaw, D. B., Jr., Sonninen, P., Vermathen, P., Heerschap, A., Masur, H. and et al. (1995). Localized proton NMR spectroscopy in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease: a multicenter pilot study. *Magnetic Resonance in Medicine* 33(5):589-594.

Hore, P. J. (1983). Solvent suppression in Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Magnetic Resonance* 55:283-300.

- Hoult, D. I. (1987).** "Shimming" on spatially localized signals. *Journal of Magnetic Resonance* 73:174-177.
- Howarth, M. A., Lian, L. Y., Hawkes, G. E. and Sales, K. D. (1986).** Formalisms for the description of multiple-pulse NMR experiments. *Journal of Magnetic Resonance* 68:433-452.
- Hurd, R. E., Gurr, D. and Sailasuta, N. (1998).** Proton spectroscopy without water suppression: the oversampled J-resolved experiment. *Magnetic Resonance in Medicine* 40:343-347.
- Hyder, F., Chase, J. R., Behar, K. L., Mason, G. F., Siddeef, M., Rothman, D. L. and Shulman, R. G. (1996).** Increased tricarboxylic acid cycle flux in the rat brain during forepaw stimulation detected with ^1H [^{13}C] NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93:7612-7617.
- Hyder, F., Renken, R. and Rothman, D. L. (1999).** In vivo carbon-edited detection with proton echo-planar spectroscopic imaging (ICED PEPSI): [3,4- $^{13}\text{C}_2$]glutamate/glutamine tomography in rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine* 42:997-1003.
- Hyder, F., Rothman, D. L., Mason, G. F., Rangarajan, A., Behar, K. L. and Shulman, R. G. (1997).** Oxidative glucose metabolism in rat brain during single forepaw stimulation: A spatially localized ^1H [^{13}C] nuclear magnetic resonance study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17:1040-1047.
- Inubushi, T., Morikawa, S., Kito, K. and Arai, T. (1993).** ^1H -detected in vivo ^{13}C NMR spectroscopy and imaging at 2T magnetic field: efficient monitoring of ^{13}C -labeled metabolites in the rat brain derived from 1- ^{13}C glucose. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191(3):866-872.
- Jenkins, B. G., Brouillet, E., Chen, Y. C., Storey, E., Schulz, J. B., Kirschner, P., Beal, M. F. and Rosen, B. R. (1996).** Non-invasive neurochemical analysis of focal excitotoxic lesions in models of neurodegenerative illness using spectroscopic imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16(3):450-461.
- Jenkins, B. G., Klivenyi, P., Kustermann, E., Andreassen, O. A., Ferrante, R. J., Rosen, B. R. and Beal, M. F. (2000).** Nonlinear decrease over time in N-acetyl aspartate levels in the absence of neuronal loss and increases in glutamine and glucose in transgenic Huntington's disease mice. *Journal of Neurochemistry* 74(5):2108-2119.
- Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F. and Rosen, B. R. (1993).** Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ^1H 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. and Koroshetz, W. J. (1998).** ^1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 50(5):1357-1365.
- Keltner, J. R., Wald, L. L., Christensen, J. D., Maas, L. C., Moore, C. M., Cohen, B. M. and Renshaw, P. F. (1996).** A technique for detecting GABA in the human brain with

PRESS localization and optimized refocusing spectral editing radiofrequency pulses. *Magn Reson Med* 36(3):458-461.

Keltner, J. R., Wald, L. L., Frederick, B. D. and Renshaw, P. F. (1997). In vivo detection of GABA in human brain using a localized double-quantum filter technique. *Magnetic Resonance in Medicine* 37(3):366-371.

Larsson, H. B., Christiansen, P., Jensen, M., Frederiksen, J., Heltberg, A., Olesen, J. and Henriksen, O. (1991). Localized in vivo proton spectroscopy in the brain of patients with multiple sclerosis. *Magnetic Resonance in Medicine* 22(1):23-31.

Lee, W. T., Lee, C. S., Pan, Y. L. and Chang, C. (2000). Temporal changes of cerebral metabolites and striatal lesions in acute 3-nitropropionic acid intoxication in the rat. *Magnetic Resonance in Medicine* 44(1):29-34.

Magistretti, P. J. (1999). Brain energy metabolism. in *Fundamental Neuroscience* edited by M. J. Zigmond, F. E. Bloom, S. C. Landis, J. L. Roberts and L. R. Squire. Academic Press. pp.389-413.

Magistretti, P. J. and Pellerin, L. (1996). Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 777:380-387.

Malcon, C., Kaddurah-Daouk, R. and Beal, M. F. (2000). Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Research* 860(1-2):195-198.

Martin, W. R., Clark, C., Ammann, W., Stoessl, A. J., Shtybel, W. and Hayden, M. R. (1992). Cortical glucose metabolism in Huntington's disease. *Neurology* 42(1):223-229.

Mason, G. F., Behar, K. L., Rothman, D. L. and Shulman, R. G. (1992a). NMR determination of intracerebral glucose concentration and transport kinetics in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12:448-455.

Mason, G. F., Gruetter, R., Rothman, D. L., Behar, K. L., Shulman, R. G. and Novotny, E. J. (1995). Simultaneous determination of the rates of the TCA cycle, glucose utilization, α -ketoglutarate/glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by NMR. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 15:12-25.

Mason, G. F., Pan, J. W., Chu, W.-J., Newcomer, B. R., Zhang, Y., Orr, R. and Hetherington, H. P. (1999). Measurement of the tricarboxylic acid cycle rate in human grey and white matter *in vivo* by ^1H - ^{13}C magnetic resonance spectroscopy at 4.1T. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19:1179-1188.

Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L. and Shulman, R. G. (1992b). NMR determination of the TCA cycle rate and α -ketoglutarate/glutamate exchange rate in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12:434-447.

Matson, G. B. (1994). An integrated program for amplitude-modulated RF pulse generation and re-mapping with shaped gradients. *Magnetic Resonance Imaging* 12(8):1205-1225.

- Matthews, R. T., Yang, L., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Rosen, B. R., Kaddurah-Daouk, R. and Beal, M. F. (1998).** Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience* 18(1):156-163.
- Merkle, H., Wei, H., Garwood, M. and Ugurbil, K. (1992).** B₁-insensitive heteronuclear adiabatic polarization transfer for signal enhancement. *Journal of Magnetic Resonance* 99:480-494.
- Mescher, M., Merkle, H., Garwood, M. and Gruetter, R. (1998).** Simultaneous *in vivo* spectral editing and water suppression. *NMR in Biomedicine* 11:266-272.
- Michaelis, T., Merboldt, K. D., Bruhn, H., Hänicke, W. and Frahm, J. (1993).** Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain *in vivo*: Quantification of localized proton MR spectra. *Radiology* 187:219-227.
- Michaelis, T., Wick, M., Fujimori, H., Matsumura, A. and Frahm, J. (1999).** Proton MRS of oral creatine supplementation in rats. Cerebral metabolite concentrations and ischemic challenge. *NMR in Biomedicine* 12(5):309-314.
- Miller, B. L. (1991).** A review of chemical issues in ¹H NMR spectroscopy: N-acetyl-L-aspartate, creatine and choline. *NMR in Biomedicine* 4(2):47-52.
- Moats, R. A., Ernst, T., Shonk, T. K. and Ross, B. D. (1994).** Abnormal cerebral metabolite concentrations in patients with probable Alzheimer disease. *Magnetic Resonance in Medicine* 32(1):110-115.
- Morris, G. A. and Freeman, R. (1978).** Selective excitation in Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Magnetic Resonance* 29:433-462.
- Morris, G. A. and Freeman, R. (1979).** Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society* 101:760-762.
- Novotny, E. J., Ogino, T., Rothman, D. L., Petroff, O. A. C., Prichard, J. W. and Shulman, R. G. (1990).** Direct carbon versus proton heteronuclear editing of 2-¹³C ethanol in rabbit brain *in vivo*: a sensitivity comparison. *Magnetic Resonance in Medicine* 16:431-443.
- Pan, J. W., Mason, G. F., Vaughan, J. T., Chu, W. J., Zhang, Y. and Hetherington, H. P. (1997).** ¹³C editing of glutamate in human brain using J-refocused coherence transfer spectroscopy at 4.1 T. *Magnetic Resonance in Medicine* 37:355-358.
- Pauly, J., Le Roux, P., Nishimura, D. and Macovski, A. (1991).** Parameter relations for the Shinnar-Le Roux selective excitation pulse design algorithm. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 10:53-65.
- Pellerin, L. and Magistretti, P. J. (1994).** Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91(22):10625-10629.

- Pfeuffer, J., Tkac, I., Choi, I.-Y., Merkle, H., Ugurbil, K., Garwood, M. and Gruetter, R. (1999a).** Localized in vivo ^1H NMR detection of neurotransmitter labeling in rat brain during infusion of $[1-^{13}\text{C}]$ D-glucose. *Magnetic Resonance in Medicine* 41:1077-1083.
- Pfeuffer, J., Tkac, I., Provencher, S. W. and Gruetter, R. (1999b).** Toward an *in vivo* neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time ^1H NMR spectra of the rat brain. *Journal of Magnetic Resonance* 141:104-120.
- Piérard, C., Pérès, M., Satabin, P., Guezennec, C. Y. and Lagarde, D. (1999).** Effects of GABA-transaminase inhibition on brain metabolism and amino-acid compartmentation: an *in vivo* study by 2D ^1H -NMR spectroscopy coupled with microdialysis. *Experimental Brain Research* 127(3):321-327.
- Plateau, P. and Guéron, M. (1982).** Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences. *Journal of the American Chemical Society* 104:7310-7311.
- Provencher, S. (1993).** Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic Resonance in Medicine* 30:672-679.
- Ross, B. D., Hoang, T. Q., Bluml, S., Dubowitz, D., Kopyov, O. V., Jacques, D. B., Lin, A., Seymour, K. and Tan, J. (1999).** In vivo magnetic resonance spectroscopy of human fetal neural transplants. *NMR in Biomedicine* 12(4):221-236.
- Rothman, D. L., Behar, K. L., Hetherington, H. P., den Hollander, J. A., Bendall, M. R., Petroff, O. A. C. and Shulman, R. G. (1985).** ^1H -observe/ ^{13}C -decouple spectroscopic measurements of lactate and glutamate in the rat brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82:1633-1637.
- Rothman, D. L., Behar, K. L., Hetherington, H. P. and Shulman, R. G. (1984).** Homonuclear ^1H double-resonance difference spectroscopy of the rat brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81:6330-6334.
- Rothman, D. L., Novotny, E. J., Shulman, G. I., Howseman, A. M., Petroff, O. A. C., Mason, G., Nixon, T., Hanstock, C. C., Prichard, J. W. and Shulman, R. G. (1992).** ^1H - $[^{13}\text{C}]$ NMR measurements of $[4-^{13}\text{C}]$ glutamate turnover in human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:9603-9606.
- Rothman, D. L., Petroff, O. A. C., Behar, K. L. and Mattson, R. H. (1993).** Localized ^1H NMR measurement of γ -aminobutyric acid in human brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90:5662-5666.
- Ruiz-Cabello, J., Vuister, G. W., Moonen, C. T. W., van Gelderen, P., Cohen, J. S. and van Zijl, P. C. M. (1992).** Gradient-enhanced heteronuclear correlation spectroscopy. Theory and experimental aspects. *Journal of Magnetic Resonance* 100:282-302.
- Sanchez-Pernaute, R., Garcia-Segura, J. M., del Barrio Alba, A., Viano, J. and de Yebenes, J. G. (1999).** Clinical correlation of striatal ^1H MRS changes in Huntington's disease. *Neurology* 53(4):806-812.

- Shaka, A. J., Keeler, J. and Freeman, R. (1983).** Evaluation of a new broadband decoupling sequence : WALTZ-16. *Journal of Magnetic Resonance* 53:313-340.
- Shen, J., Novotny, E. J. and Rothman, D. L. (1998).** *In vivo* lactate and β -hydroxybutyrate editing using a pure-phase refocusing pulse train. *Magnetic Resonance in Medicine* 40:783-788.
- Shen, J., Petersen, K. F., Behar, K. L., Brown, P., Nixon, T. W., Mason, G. F., Petroff, O. A. C., Shulman, G. I., Shulman, R. G. and Rothman, D. L. (1999a).** Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by *in vivo* ^{13}C NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96:8235-8240.
- Shen, J., Rycyna, R. E. and Rothman, D. L. (1997).** Improvement of an *in vivo* automatic shimming method (FASTERMAP). *Magnetic Resonance in Medicine* 38:834-839.
- Shen, J., Shungu, D. C. and Rothman, D. L. (1999b).** *In vivo* chemical shift imaging of γ -aminobutyric acid in the human brain. *Magnetic Resonance in Medicine* 41:35-42.
- Sherry, A. D. and Malloy, C. R. (1994).** Cardiac metabolism. in *NMR in physiology and biomedicine* edited by R. J. Gillies. Academic Press. pp.439-449.
- Shulman, R. G. and Rothman, D. L. (1998).** Interpreting functional imaging studies in terms of neurotransmitter cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95(20):11993-11998.
- Shulman, R. G., Rothman, D. L. and Hyder, F. (1999).** Stimulated changes in localized cerebral energy consumption under anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96(6):3245-3250.
- Sibson, N. R., Dhankhar, A., Mason, G. F., Behar, K. L., Rothman, D. L. and Shulman, R. G. (1997).** *In vivo* ^{13}C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94:2699-2704.
- Sibson, N. R., Dhankhar, A., Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L. and Shulman, R. G. (1998a).** Stoichiometric coupling of brain metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95:316-321.
- Sibson, N. R., Shen, J., Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L. and Shulman, R. G. (1998b).** Functional energy metabolism: *in vivo* ^{13}C -NMR spectroscopy evidence for coupling of cerebral glucose consumption and glutamatergic neuronal activity. *Developmental Neuroscience* 20:321-330.
- Sørensen, O. W., Eich, G. W., Levitt, M. H., Bodenhausen, G. and Ernst, R. R. (1983).** Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 16:163-192.
- Tyszka, J. M. and Silverman, J. M. (1998).** Navigated single-voxel proton spectroscopy of the human liver. *Magnetic Resonance in Medicine* 39:1-5.

van den Bergh, A. J., van den Boogert, H. J. and Heerschap, A. (1998). Heteronuclear cross polarization for enhanced sensitivity of in vivo ^{13}C MR spectroscopy on a clinical 1.5 T MR system. *Journal of Magnetic Resonance* 135:93-98.

van Zijl, P. C. M., Chesnick, A. S., DesPres, D., Moonen, C. T. W., Ruiz-Cabello, J. and van Gelderen, P. (1993). In vivo proton spectroscopy and spectroscopic imaging of {1- ^{13}C }-glucose and its metabolic products. *Magnetic Resonance in Medicine* 30:544-551.

Waniewski, R. A. and Martin, D. L. (1998). Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *Journal of Neuroscience* 18(14):5225-5233.

Watanabe, H., Ishihara, Y., Okamoto, K., Oshio, K., Kanamatsu, T. and Tsukada, Y. (2000a). 3D localized ^1H - ^{13}C heteronuclear single-quantum coherence correlation spectroscopy in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine* 43(2):200-210.

Watanabe, H., Umeda, M., Ishihara, Y., Okamoto, K., Oshio, K., Kanamatsu, T. and Tsukada, Y. (2000b). Human brain glucose metabolism mapping using multislice 2D ^1H - ^{13}C correlation HSQC spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 43(4):525-533.

Weber, O. M., Verhagen, A., Duc, C. O., Meier, D., Leenders, K. L. and Boesiger, P. (1999). Effects of vigabatrin intake on brain GABA activity as monitored by spectrally edited magnetic resonance spectroscopy and positron emission tomography. *Magnetic Resonance Imaging* 17(3):417-425.

Wick, M., Fujimori, H., Michaelis, T. and Frahm, J. (1999). Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. *Magnetic Resonance in Medicine* 42(4):798-802.

Wilman, A. H. and Allen, P. S. (1993). In vivo NMR detection for γ -aminobutyric acid, utilizing proton spectroscopy and coherence-pathway filtering with gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 101:165-171.

Wilman, A. H. and Allen, P. S. (1995). Yield enhancement of a double-quantum filter sequence designed for the edited detection of GABA. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 109:169-174.

Spectroscopie RMN *in vivo* du cerveau à 3 Tesla : développements méthodologiques pour l'étude de modèles animaux de la maladie de Huntington.

Le but de ce travail de thèse était de développer de nouveaux outils pour étudier par spectroscopie RMN *in vivo* à 3 Tesla des modèles animaux (rat et primate) de la maladie de Huntington. La première partie présente trois développements méthodologiques originaux. Tout d'abord, une nouvelle méthode est décrite pour corriger la fréquence du spectromètre en temps réel, en utilisant le signal de l'eau intracérébrale comme référence de fréquence. Cette méthode permet d'acquérir des spectres stables même en présence d'une dérive de la fréquence de l'aimant. Ensuite, une nouvelle méthode appelée Semiselective Proton-Observed Carbon-Edited (SPOCE) est proposée pour détecter séparément et simultanément en proton les signaux du [4-¹³C]glutamate et du [3-¹³C]glutamate, alors que ces signaux se superposent à 3 tesla. Cette nouvelle technique rend possible la mesure en proton des cinétiques de marquage ¹³C des carbones 3 et 4 du glutamate à partir du [1-¹³C]glucose à champ intermédiaire. La modélisation de ces cinétiques permet de calculer la vitesse du cycle de Krebs. Enfin, une nouvelle méthode est suggérée pour mesurer directement par spectroscopie différentielle la résonance du GABA sans contamination par le signal des macromolécules. Ces trois développements méthodologiques sont analysés en détail, puis validés *in vitro* et *in vivo*. La deuxième partie de ce mémoire décrit les premières applications de ces développements au modèle animal 3-NP de la maladie de Huntington. Celle-ci se caractérise par une dégénérescence sélective des neurones GABA dans le striatum associée à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique. L'intoxication au 3-NP provoque des lésions similaires chez l'animal. Une première application montre que le NAA est un marqueur réversible de dysfonctionnement neuronal. Une deuxième étude porte sur l'éventuel effet neuroprotecteur de la créatine. Enfin, il est montré que la vitesse du cycle de Krebs est réduite de 17% après une intoxication aiguë au 3-NP chez le rat.

***In vivo* NMR spectroscopy of brain at 3 Tesla : methodological developments for studying animal models of Huntington's disease**

The aim of this work was to develop new MR methods dedicated to the exploration of animal models (rat and primate) of Huntington's disease by *in vivo* NMR spectroscopy at 3 Tesla. The first part presents three original methodological developments. First of all, a new method is described to correct the spectrometer frequency on the fly using the intracerebral water signal as a frequency reference. This method allows for acquisition of stable spectra even in presence of a field-frequency drift. Secondly, a new method called Semiselective Proton-Observed Carbon-Edited (SPOCE) is proposed to detect separately and simultaneously the proton signals of [4-¹³C]glutamate and [3-¹³C]glutamate, even though these signals overlap at 3 Tesla. This new technique allows for the measurement of ¹³C labeling kinetics of glutamate carbons 3 and 4 from [1-¹³C]glucose at intermediate field. The tricarboxylic acid (TCA) cycle rate can be calculated by fitting a metabolic model to these kinetic data. Finally, a new method is dedicated to direct GABA concentration measurement without contamination by macromolecules. These three methodological developments are analyzed in detail, then validated *in vitro* and *in vivo*. The second part of this manuscript describes the first applications of these developments to the 3-NP animal model of Huntington's disease. This disease is characterized by a selective degeneration of GABAergic neurons in the striatum associated to a dysfunction of energy metabolism. 3-NP intoxication yields similar lesions in animals. A first application shows that NAA is a reversible marker of neuronal dysfunction. A second study focuses on potential neuroprotective effects of creatine. Finally, it is showed that the TCA cycle rate is reduced by 17% after acute 3-NP intoxication in rats.