

construire l'avenir®

de la recherche à l'industrie



## UNIVERSITÉ PARIS-SUD

### ÉCOLE DOCTORALE 422 : SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'INFORMATION DES TÉLÉCOMMUNICATIONS ET DES SYSTÈMES

Laboratoire : Unité d'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire et de Spectroscopie

# THÈSE DE DOCTORAT

PHYSIQUE

Par

### Alfredo L. LOPEZ KOLKOVSKY

### Spectroscopie RMN du <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P pour l'Étude du Métabolisme Cérébral à Très Haut Champ Magnétique du Rongeur à l'Homme

Date de soutenance : 08/06/2015

### Composition du jury :

Directeur de thèse : Encadrant de thèse :	Gilles BLOCH Fawzi BOUMEZBEUR	Directeur, CEA/DSV Ingénieur Chercheur, CEA/DSV/I2BM/NeuroSpin
Rapporteurs :	Malgorzata MARJANSKA Angèle VIOLA	Professeur, Dépt. de Radiologie, CMMR, Université de Minnesota Directeur de Recherche CNRS, CRMBM, Université Aix-Marseille
Examinateurs :	Marie POIRIER-QUINOT Hélène RATINEY	Maître de Conférence, Université Paris-Sud XI Chargé de Recherche CNRS, CREATIS, Université Lyon 1

## INTRODUCTION GENERALE

L'étude du métabolisme du cerveau et sa biochimie associée est d'une grande importance pour la compréhension de l'évolution des états physiologiques tels que la maturation du cerveau et de vieillissement, mais aussi pour la caractérisation et le suivi de pathologies cérébrales, à savoir les maladies neurodégénératives. Avec l'amélioration de nos systèmes de santé au cours des dernières décennies, l'espérance de vie moyenne augmente et la proportion de la population âgée (plus de 60 ans) devrait doubler dans le monde entier au cours des 50 prochaines années.

Le vieillissement est le principal facteur de risque de développer des maladies neurodégénératives et parmi eux, la maladie d'Alzheimer est la sixièmecause de décès aux Etats-Unis. En 2000, la démence a affecté près de 30% de la population âgée en France entre l'âge de 85 et 89 ans. Une première étape pour la compréhension et l'établissement de biomarqueurs précoces dans le développement des maladies neurodégénératives est la compréhension de son principal facteur de risque, le vieillissement normal. Il est donc essentiel de caractériser les changements progressifs qui ont lieu pendant le vieillissement normal du cerveau à partir d'un point de vue moléculaire.

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (SRMN) est une technique non invasive qui permet de mesurer les concentrations de molécules biologiquement pertinents impliqués dans les grandes voies métaboliques, avec une sensibilité allant jusqu'au millimolaire. Ces «métabolites» jouent le rôle des biomarqueurs pour différentes fonctions métaboliques, tels que la neurotransmission (du glutamate, de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou GABA), des neurones et des densités gliales (du N-acétyl-aspartate, du myo-inositol), turn-over membrane (de la choline , des protéines visibles par RMN) et le métabolisme énergétique (créatine, ATP), entre autres. D'autres techniques d'imagerie existent, comme la tomographie par émission de positons (TEP), qui sont suffisamment sensibles pour détecter les concentrations picomolaires. Cependant, elles nécessitent des traceurs radioactifs exogènes tandis que la SRMN typique utilise des molécules endogènes en tant que sources de signaux.

L'intensité du signal détecté en RMN est directement influencée par la force du champ magnétique statique. Avec l'avènement de l'augmentation des intensités du champ magnétique, la technique de SRMN peut atteindre des nouveaux horizons par des résolutions spectrales et spatiales plus élevées, ce qui améliore la fiabilité et la spécificité des mesures SRMN (figure 1). En prenant en compte le niveau du bruit, le rapport du signal sur bruit augment linéairement avec l'intensité du champ magnétique (Radpath, 1998).

Mais les difficultés et défis sont accrus aussi avec des champs magnétiques plus forts et donc des problèmes techniques se posent en raison de la non-homogénéité accrue de la radiofréquence (B<sub>1</sub>) et des champs magnétiques statiques (B<sub>0</sub>). L'application de pulses radiofréquence (RF), lesquels sont nécessaires à la génération du signal de RMN mesurée, contribuent également aux difficultés rencontrées à ultra-haut champs (UHC) car leur demandes en énergie augmentent aussi avec l'intensité du champ magnétique. Le scientifique en RMN doit donc être très attentif aux limites d'utilisation du matériel en termes de puissances RF employés mais aussi à l'énergie absorbée par la tête par la dissipation d'énergie du pulse RF appliquée, conduisant potentiellement à l'élévation de température au-dessus des limites de sécurité (Hoult, et al., 2000). En outre, la longueur d'onde des pulses RF associée à la fréquence du <sup>1</sup>H à 7 T est de l'ordre du 12 cm et donc de la tête humaine, ce qui génére des motifs d'interférence qui comploquent davantage la homogeneité du champ B<sub>1</sub> (Yang, et al., 2002; Vaughan, et al., 2001).

Pour répondre à ces limitations à UHC, l'introduction de méthodes à la pointe est nécessaire pour l'acquisition de spectres robustes et de haute qualité. Les contraintes techniques et de sécurité, étant moins restrictives pour les études sur des animaux, permettent l'utilisation d'un plus large panel de techniques pour réduire l'impact des inhomogeneités du champ  $B_1$ , à savoir en utilisant impulsions RF adiabatiques exigeants en énergie.

L'application de ces impulsions étant assez limité pour les études humaines à UHC, une approche basée sur l'utilisation efficace de la puissance disponible est préféré. La méthode de transmission parallèle (pTx) est l'une des solutions les plus prometteuses pour lutter contre des inhomogénéités de champ  $B_1$  dans le cerveau humain. Elle fait une utilisation efficace de la puissance autorisée disponible par l'adaptation de la phase et l'amplitude de chaque élément résonateur en fonction du volontaire et du champ  $B_1$  ciblée. En outre, des motifs d'interférence de phase peuvent être avantageusement exploités pour supprimer des signaux parasites générés par le tissu à l'extérieur du crâne.

Les mésures par SRMN des noyaux autres que l'hydrogène (<sup>1</sup>H), comme par exemple le phosphore (<sup>31</sup>P), sont difficiles en raison de leur sensibilité intrinsèquement faible. Cette sensibilité réduite est quelque peu compensée en UHC par l'augmentation brute du signal. Par la spectroscopie RMN du <sup>31</sup>P il est possible de détecter l'ATP et la phosphocréatine, lesquels sont particulièrement importants en raison de leurs rôles clés dans le métabolisme énergétique. Par conséquent, l'acquisition des profils métaboliques en <sup>31</sup>P peut compléter l'information métabolique déjà riche dérivée de profils neurochimiques par <sup>1</sup>H SRMN.

Ce projet de thèse a été réalisée à l'Unité d'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire et de Spectroscopie (UNIRS), attaché à NeuroSpin au Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives (CEA) situé à Gif-sur-Yvette, Essonne, France. Plusieurs scanners horizontaux sont actuellement présents à NeuroSpin, dont trois scanners IRM Bruker à 7, 11,7 et 17,2 T dédiés aux études sur les rongeurs et aussi deux scanners IRM Siemens à 3 et 7 T dédiés pour les études humaines. Le scanner clinique T 7 est également équipé d'un système en transmission parallèle, ce qui permet de contrôler des antennes de transmission multiple à huit canaux.

Dans ce contexte, les travaux ont été centrés dans la mise en place des séquences en <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P à 17,2 T et de leur application à un étude du vieillissement cérébral chez le rat Dark Agouti. En parallèle, des séquences d'imagerie spectroscopique par RMN (ISRMN) en <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P ont été développées pour leur application clinique à 7 T en utilisant des émetteurs multicanal (pTx) ou en mode clinique à un seul canal de transmission.

Le manuscrit présenté en anglais est divisé en trois parties:

La première partie explique le contexte méthodologique de cette thèse. Chapitre 1 commence par introduire les concepts fondamentaux de la spectroscopie RMN. Ensuite, il fournit une brève présentation des impulsions RF et des séquences de localisation ainsi que des aspects connexes tels que le dépôt de l'énergie et des artefacts de déplacement chimique. Il finalise par une vision prospective des gains et des inconvénients de SRMN à UHC. Le chapitre 2 présente toutes les considérations pratiques et techniques mises en œuvre. Il comprend une brève description des 7 T clinique et 17,2 T scanners précliniques, la mise en œuvre et à la validation *in vitro* du module des bandes de suppression « BISTRO » sur les deux types de systèmes ainsi que l'optimisation numérique de la méthode de suppression d'eau « WET ». La méthode correspondante aux décompositions spectrales du <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P à l'aide du logiciel LCModel est présentée, en détaillant le paramétrage de la ligne de base des macromolécules pour l'analyse de spectres

<sup>1</sup>H du cerveau du rat. La stratégie de quantification absolue des métabolites pour <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P données est expliquée. Enfin, des considérations pratiques pour l'acquisition de cartes de l'eau de temps de relaxation  $T_1$  à 17,2 T sont présentées.

Dans la deuxième partie, le travail effectué à 17,2 T en utilisant la spectroscopie in vivo quantitative <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P MR est présenté. Le chapitre 3 présente une étude longitudinale <sup>1</sup>H SRMN du vieillissement du cerveau chez le rat Dark Agouti sur une période de 18 mois. Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  mesurées dans un VOI ainsi que les concentrations de métabolites de quatre VOIs dans des jeunes rats à 1 mois d'âge sont présentés. Ces temps de relaxation sont comparés à ceux mesurées à des champs magnétiques plus bas, afin d'évaluer leur dépendance au champ magnétique. L'évolution de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  ainsi que les profils neurochimiques du 4 VOIs sont ensuite présentés et examinés à l'aide d'une analyse de régression linéaire. Le chapitre 4 présente une étude préliminaire <sup>31</sup>P SRMN quantitatif regardant un sousensemble de nos rats Dark Agouti précédemment étudiées à des âges de 5, 17 et 21 mois. Les résultats des profils métaboliques acquis et les temps de  $T_1$  mesurées à partir de 8 animaux sont présentés. Les limitations et les problèmes rencontrés, notamment en raison des artefacts de déplacement chimique, sont discutées.

La troisième partie présente les développements et résultats obtenus en ISRMN sur le scanner clinique à 7 T. Dans le chapitre 5, l'approche de transmission parallèle est présentée ainsi comme les configurations de «  $B_1$ -shimming » statique obtenus par l'utilisation des modes propres (ou « anneaux ») de l'antenne à 8 voies. L'utilisation de ces anneaux comme bandes de suppression du volume extérieur (OVS) sont évaluées *in vitro* et comparées à des configurations «  $B_1$ -shimming » statique obtenus par optimisation numérique. Le chapitre 6 présente l'évaluation des séquences <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P en IRM et ISRMN pour la constitution d'un protocole clinique, y compris l'acquisition des cartes de métabolites en <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P. Le régime WET optimisée numériquement est validé *in vivo* en combinaison avec une séquence CSI-STEAM 2D. Des configurations des bandes OVS adiabatiques et classiques sont évaluées selon leur efficacité et dépôt d'énergie. Le manuscrit en anglais est conclu avec un résumé des principaux résultats de cette thèse projet et quelques perspectives pour les futurs travaux en spectroscopie MR.

Ce résume en français omet la majeure partie des chapitres du manuscrit en anglais et se concentre sur les résultats principaux de la thèse. Le chapitre 5 et la conclusion générale ont été omis.



Figure 1. Amélioration de la qualité des donnés SRMN avec le champ magnétique statique  $B_0$ . L'augmentation de l'intensité du champ magnétique améliore le SNR, la résolution spectrale et simplifie les patterns de J-couplage. Les spectres présentes ont été acquis chez le cerveau du rat *in vivo* à différentes champs magnétiques. Une séquence LASER a été utilisé pour l'acquisition des spectres à 11,7 T (TE = 25 ms, TR = 3s) et à 17,2 T (TE = 16,5 ms, TR = 5s) . Le spectre à 7 T a été mesurée avec STEAM (TE = 3, TR = 1.5s). Aucun filtrage a été appliqué.

## PARTIE I: CONTEXTE METHODOLOGIQUE

### 1. ASPECTS THEORIQUES

En mécanique quantique, les particules élémentaires comme les protons ou les neutrons possèdent un moment angulaire appelé spin.

En présence d'un champ magnétique statique **B**<sub>0</sub>, un noyau possédant un spin +1/2 aura une fréquence de précession  $v_0$  donné par l'équation de Larmor:

$$\nu_0 = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right) \mathbf{B}_0$$

où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique du noyau. Néanmoins, le noyau est entouré par des électrons qui s'opposent au champ magnétique **B**<sub>0</sub>. Ceci induit un effet de blindage qui réduit le champ magnétique effectif ressenti par le noyau. Ce changement dans le champ magnétique induit un décalage fréquentiel sur la fréquence de précession du noyau appelé décalage chimique. Le décalage chimique dépend de l'environnement chimique du noyau et il est exprimé en part per million (PPM) selon une molécule de référence, tels que le tetra-methyl-silane pour l'hydrogène (<sup>1</sup>H) ou le hexa-methyl-phosphore-triamide pour le noyau phosphore (<sup>31</sup>P).

L'application d'un pulse radiofréquence (RF) à la fréquence de Larmor de la population des spins d'intérêt permet de leur exciter vers le plan transversal au champ  $B_0$  et la force électromotrice généré par les spins en précession peut être mesuré par une sonde.

Plusieurs séquences des pulses RF existent et pendant cette thèse trois séquences de spectroscopie ont été utilisés :

#### 1.1. FID

La séquence pulse-acquisition ou « FID » est la méthode de l'acquisition du signal plus simple car elle se compose d'une impulsion RF non-sélective avant de faire l'enregistrement du signal généré. Un volume d'intérêt (VOI) peut être sélectionné en utilisant un ensemble de bands de suppression du volume extérieur avant l'impulsion d'excitation. Pour améliorer l'efficacité des suppression de bandes OVS, des pulses RF modulés en fréquence sont préférablement utilisés.

#### 1.2. STEAM

STEAM est une technique de localisation robuste composée de trois impulsions RF de 90° sélectives spatialement (figure 2) (Frahm, et al., 1987). En raison de la nature des impulsions, il génère un total de 5 échos de spin et 3 FID, où l'intervalle de temps entre les deux premières impulsions est TE / 2 et le temps entre les deux derniers est le temps de mélange ou TM (Hahn, 1950). Seulement l'écho stimulé à t = TE + TM est intéressant car il correspond au signal généré exclusivement à partir du VOI. Autres signaux RMN sont détruits par l'application de gradients de déphasage. En raison de l'application d'un gradient de déphasage pendant le TM, seulement la moitié de l'aimantation totale disponible peut être réorienté.

#### 1.3. LASER

La séquence de LASER est une séquence de localisation qui permet une définition du VOI très nette et elle est très peu sensible aux inhomogénéités du champ d'excitation B<sub>1</sub>.

Elle consiste d'une impulsion RF non-sélective de 90° suivie par trois paires d'impulsions d'inversion adiabatiques et sélectives spatialement (figure 3). Chaque impulsion est entourée par des gradients de déphasage pour détruire le signal à l'extérieur de la coupe sélectionnée (Garwood, et al., 2011). En utilisant des impulsions adiabatiques avec une bande-passante élevée, des profils de sélection très nets peuvent être atteints tout en réduisant des artefacts de déplacement chimique. Néanmoins, un des inconvénients de LASER c'est le dépôt d'énergie élevée, en raison de ces trois paires d'impulsion d'inversion adiabatiques. Ceci rendre son application difficile à haut champ chez l'humain.

#### 1.4. Imagerie Spectroscopique RM

La technique d'imagerie spectroscopique par résonance magnétique (ISRM) permet l'acquisition simultanée de différents volumes (voxels) qui peut être utilisé ensuite pour le calcul des cartes de distribution des métabolites dans le cerveau.

Les séquences d'impulsion ISRM sont constituées par une localisation telle que la FID, STEAM ou LASER suivis par un encodage spatial en 2 ou 3 dimensions.



Figure 2. Séquence d'impulsions de la méthode de localisation STEAM

La séquence d'impulsions STEAM se compose de trois impulsions d'excitation à 90° appliqués sur l'axe de rotation. Après la seconde impulsion à 90°, l'aimantation du plan XY est rotée dans l'axe XZ. L'application des gradients de déphasage forts (G2) pendant le temps de mélange supprime toute composante transversale (XY), en laissant seulement une aimantation cohérente nette sur l'axe longitudinal (Z). Le deuxième gradient de déphasage G1 permet de détruire le signal FID indésirable de la troisième impulsion d'excitation et compense pour le premier gradient G1, permettant la formation de l'écho stimulé. Le deuxième spoiler G1 contient également les gradients de recentrage. Pour éviter l'apparition des FID ou des échos de spin indésirables, G1 doit être différent de  $\pm$  G2 ou  $\pm$  G2/2 (de Graaf, 2007).



90° 180° 180° 180° 180° 180° 180°

Figure 3. Séquence d'impulsions de la méthode de localisation LASER La séquence de pulse LASER consistes d'une impulsion 90° non-localisée suivie par trois paires des impulsions à 180° sélectives spatialement adiabatiques. Des gradients de déphasage au tour de chaque impulsion de recentrage déphasent le signal en dehors de la coupe sélectionné. Le temps d'écho total est la somme des 3 temps d'écho indépendants. Pour améliorer la insensibilité aux inhomogénéités du champ B<sub>1</sub> un pulse adiabatique de 90° peut être utilisé.

### 2. Aspects Methodologiques

Les études chez le rongeur ont étés réalisés principalement avec des séquences SRM monovoxel. Les séquences comprises ont été FID-OVS, STEAM et LASER. Elles ont été créées ou adaptées à partir de méthodes Bruker déjà existants sur la plateforme de programmation de Paravision 5.1. Des séquences ISRM avec localisation FID-OVS et STEAM ont été développées sur la plateforme de développement IDEA pour des études chez l'humain.

#### 2.1 B<sub>1</sub>-insensitive train to obliterate signal (BISTRO) bands

Pour améliorer la qualité de sélection du volume par OVS dans les séquences du tipe FID, le module BISTRO (par son acronyme en anglais,  $B_1$ -insensitive train to obliterate signal (Luo, et al., 2001) a été implémenté. Ce module permet d'atteindre une meilleure efficacité de suppression du signal dans de champs  $B_1$  très inhomogènes. Le schéma de suppression BISTRO consiste en l'application d'une série de *n* impulsions dont les amplitudes  $B_{1i}(t)$  sont modulés suivant la fonction de modulation d'amplitude d'un pulse adiabatique:

$$B_{1i}(t) = B_{1\max} * F_1(t) * \operatorname{sech}[\beta(1 - \frac{1-1}{n-1})]$$
(2.1)

où  $F_1$  est la fonction de modulation d'amplitude des *n* pulses individuels et  $B_{1max}$  est l'amplitude RF maximal de la dernière impulsion dans la série RF.

Des impulsions modulées en fréquence sont bien adaptés pour être utilisés dans la série d'impulsions dans BISTRO parce que leur profil d'excitation est bien conservé même s'ils n'ont pas atteint le régime d'adiabaticité. Lorsque multiple bandes BISTRO sont utilisés, l'efficacité de suppression peut-être accrue par l'entrelasage des séries d'impulsion RF, permettant ainsi d'utiliser les gradients de sélection de coupe et de déphasage de toutes les bandes pour déphaser l'aimantation transversale.

A BISTRO module was implemented in Paravision 5.1 with n=8 and combined to the pre-existent FID-OVS localization sequence. Similarly, for the acquisition of <sup>31</sup>P MRSI data in the human brain, BISTRO bands were added in a CSI-FID sequence with a maximum of 6 interleaved bands (n = 6, figure 4).



Figure 4. Chronogramme de la séquence d'impulsion BISTRO Représentation graphique d'un bande de suppression de BISTRO unique (gauche) et de 6 bandes BISTRO entrelacés dans les 3 plans orthogonaux (droite). Le chronogramme présenté ici a été fait en utilisant l'environnement de programmation d'impulsion IDEA et il montre les impulsions RF et les gradients utilisés dans les trois directions orthogonales.

#### 2.2 Paramétrage de la ligne de base de macromolécules sur LCModel

Á des temps d'écho courts, les spectres acquis *in vivo* dans le cerveau montrent non seulement les contributions des molécules de faible poids moléculaire mobiles tels que les métabolites, mais présentent aussi des larges contributions du signal provenant de lipides à haute masse moléculaire et de protéines (Behar, et al., 1994). Les résonances générées par ces "macromolécules" (MM) ont été en partie identifiés aux groupes méthyle et méthylène des acides aminés tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, la thréonine, l'alanine, la lysine, l'arginine, le glutamate, la glutamine et les protons α-méthine (Behar, et al., 1993). Le signal des MM provient principalement de leurs chaînes mobiles; la majeure partie de leurs protons ayant une mobilité limitée et des valeurs de temps de relaxation T<sub>2</sub> très courts, sont difficilement observés par des techniques de spectroscopie classiques. Les MM ont des propriétés physiques différentes par rapport aux métabolites: elles possèdent de temps de relaxation T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> plus courts et des coefficients de diffusion apparente 10 à 20 fois plus courts que les métabolites (de Graaf, et al., 2006; Kreis, et al., 2005; Pfeuffer, et al., 2000). Ces propriétés sont utilisées pour l'acquisition de spectres "à métabolites annulés» ou pour réduire les contributions des MM dans des spectres <sup>1</sup>H.

Les signaux des MM sont un aspect important à considérer à des courts temps d'écho en <sup>1</sup>H SMR parce qu'ils se recoupent avec les métabolites et donc peuvent introduire des erreurs de quantification systématiques aux métabolites faiblement concentrés. En outre, la quantification des MMs peut fournir de l'information clinique utile, comme car il a été démontré dans différentes pathologies telles que les accidents vasculaires cérébraux, dans la sclérose en plaques ou en présence de tumeurs (Kaminogo, et al., 2001; Saunders, et al., 1997; Narayana, et al., 1992; Davie, et al., 1994).

L'analyse des spectres à été fait avec LCModel et les limites inférieures de Cramer-Rao (LICR) a été utilisée pour déterminer l'erreur minimale attendue dans nos mesures et donc leur dégrée de fiabilité. Pour caractériser le signal des macromolécules chez le cerveau de rat, des profiles neurochimiques "à métabolites annulés" ont été acquis *in vivo* à 17.16 T avec un module de double inversion-récupération ou DIR et une localisation LASER à des temps d'écho variables (figure 5). Les spectres "à métabolites annulés" ont étés utilisés pour paramétrer la ligne de base. Les résultats du paramétrage sont montrés dans la figure 6. Ce paramétrage a été utilisé pour analyser tous les spectres acquis chez le rat à 17.16 T.



Figure 5. Spectres "à métabolites annulés" à différentes temps d'écho à 17.2 T. Spectres acquis chez le cerveau du rat en utilisant LASER (128 avg, TR = 1.8 s, TE 16,5 à 80 ms) avec pondération T<sub>1</sub> introduite avec un module DIR (TI<sub>1</sub>/TI<sub>2</sub> = 2600/600 ms). En raison de leur court T<sub>2</sub>, les resonances des MM sont déphasés rapidement avec l'augmentation du temps d'écho. Des métabolites avec des valeurs T<sub>1</sub> courts ont montré des signaux résiduels, notamment pour la Cr(CH<sub>2</sub>) et la tCho. Leurs contributions peuvent être clairement observés à TE longs.



Figure 6. Paramétrage de la ligne de base des MM chez le cerveau de rat à 17.2 T Spectre moyen des macromolécules (noir) et son fit par LCModel (rouge). Le fit de la ligne de base de MM est fait par 4 ensembles de résonances de MM. Les valeurs LICR ont été de 1% pour MM1, MM2 et MM3 et de 2% pour MM4. Aucun filtrage n'a été appliqué et tous les éléments sont dans la même échelle. En raison de leur court ou long temps de relaxation  $T_1$ , des signaux résiduels de la tCr(CH<sub>2</sub>), tCho, tNAA(CH<sub>2</sub>) et taurine ont aussi été considérés pour le fit et leur contributions ont été enlevés.

## PARTIE II: ETUDES CHEZ LE RONGEUR

## 3. ETUDE QUANTITATIVE SUR LES ALTERATIONS METABOLIQUES DANS LE CERVEAU DE RAT PENDANT LE VIEILLISSEMENT

3.1 Introduction au vieillissement cérébral sain

Le processus de vieillissement est un processus complexe associé à un déclin progressif des fonctions biologiques, cognitives et psychomotrices dont le niveau d'atteinte est partiellement déterminé par le fond génétique mais il est également influencée par la nutrition, style de vie et d'autres facteurs environnementaux (Busse, 1987).

Le vieillissement est le facteur primaire de risque pour les accidents vasculaire cérébraux (Duijn, et al., 1992; Moreno-Torres, et al., 2005) et des troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer (Heun, et al., 1997), de la maladie de Parkinson (Ellis, et al., 1997) ou d'autres tipes de démence (Kantarci, et al., 2004; Charles, et al., 1994; Kantarci, et al., 2006).

Avec l'amélioration des soins de santé au cours du siècle dernier, l'espérance de vie moyenne est passée de 68,3 ans en 1950 à 77,5 en 2003 et la proportion de personnes âgées est prévue de doubler dans le monde entier au cours des 50 prochaines ans, ce qui conduit à un plus grand taux prévisible des maladies

neurodégénératives (Hoyert, et al., 2005). À ce jour, uniquement des traitements pour les symptômes sont disponibles mais aucun remède n'a été trouvé et les coûts de la morbidité associées au vieillissement sont un défi majeur aux systèmes de santé et de services sociaux. Les dépenses associées en raison de l'hospitalisation ou de soins de garde ont été évalués à 1% du revenu brut du monde en 2010 et elles sont prévues d'augmenter dans les décennies à venir (Comas-Herrera, et al., 2007; Alzheimer's Association, 2013).

Le vieillissement cérébral normal chez l'humain a été associé à une large gamme de modifications détectées avec plusieurs techniques d'imagerie. Une perte neuronal et une réduction du volume du cerveau a été associée au vieillissement, bien que la densité neuronale reste intacte (Terry, et al., 1987; Mrak, et al., 1997; Raz, et al., 2005). Des modifications dans la matière blanche ont également été observés chez les personnes âgées et il a été associée à une connectivité fonctionnelle altérée (Almkvist, et al., 1992; O'Sullivan, et al., 2001; Esposito, et al., 1999). La réduction de l'anisotropie fractionnelle et kurtoses de diffusion a révélé des changements dans la microstructure de la matière blanche avec l'âge (Pfefferbaum, et al., 2000; Coutu, et al., 2014). Une diminution de la circulation sanguine cérébrale a également été observé dans les cortex frontal et pariétal (Loessner, et al., 1995) en utilisant la méthode de tomographie par émission de positrons (TEP). Au niveau cellulaire, le déclin progressif dans le système nerveux central a été associé à l'accumulation de dommages dûs au stress oxydatif dans la forme de composés oxygénés réactives, une altération du métabolisme énergétique cellulaire et et réparation de l'ADN, l'érosion des télomères et l'accumulation de protéines et organites endommagés (Harman, 1956; Mattson, et al., 2006; Floyd, et al., 2002; Sahin, et al., 2010).

#### 3.2 Etude chez le rat dark-agouti

De nombreuses études MRS ont regardé le vieillissement du cerveau humain (Reyngoudt, et al., 2012; Haga, et al., 2009) présentant, en général, une augmentation des composés contenant de la choline (tCho), myo-inositol (Ins) et creatine + phosphocreatine (tCr) avec l'âge. tCho et Ins sont respectivement, des biomarqueurs du métabolisme membranaire et du compartiment des cellules gliales (Jenden, 1979 pp. 13-24; Brand, et al., 1993). Les niveaux accrus de suggère une activation gliale, telle qu'elle est observée au cours de la neuro-inflammation (Chang, et al., 2013). Au contraire, les niveaux de N-acetyl-aspartate (NAA) ont montré des changements variables avec l'âge, car des résultats contradictoires ont été trouvés par differents groupes de recherche.

Un défi important pour l'étude du vieillissement du cerveau humain est la variabilité entres des sujet et le fond biologique inhomogène parmi la population âgée, ce qui rend difficile de déterminer un groupe "contrôle" pour lesquels le vieillissement "sain" pourrait être reconnu. En outre, des études longitudinales sur une cohorte humaine fixe visant à étudier les changements métaboliques à partir du jeune adulte (20 ans) jusqu'à la vieillesse (~80 ans) n'est pas pratiquement faisable.

Pour surmonter ces limitations, les rongeurs et en particulier les rats peuvent fournir un model pour examiner les aspects neurobiologiques fondamentaux du vieillissement. Dans cette thèse, la souche de rat Dark-Agouti (DA) a été choisie en raison de son augmentation du poids modéré avec l'âge, ce qui était une limitation pratique pour les expériences en SRM.

Pendant cette étude, deux cohortes de six rats avec des âges d'un mois et huit mois ont été examinés jusqu'à l'âge de 18 mois et les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  des métabolites ont aussi été mesurés. Le planning expérimental des acquisitions est présenté dans la table 1. Des profiles métaboliques ont été acquis dans quatre régions différents du cerveau (figure 7). L'acquisition des spectres a été fait avec une

séquence LASER (TE/TR = 16.5/5000 ms, 128 moyennes, 2048 points complexes) et la quantification a été fait avec LCModel (Provencher, 1993) en utilisant l'eau comme référence interne de concentration (Kaiser, et al., 2005; Kreis, et al., 1993).

Cohorte	Mésure	Âge (Mois)							
C1	Profiles Métaboliques	1	4	7	-	-	12	-	-
	Temps de Relaxation	1	4	7	-	-	-	-	-
C2	Profiles Métaboliques	-	-	-	8	11	-	14	18
	Temps de Relaxation	-	-	-	8	11	-	14	-

Table 1. Planning des acquisitions <sup>1</sup>H SRM

Les colonnes indiquent l'âge du rat à laquelle l'expérience a eu lieu pour chaque cohorte.



Figure 7. VOIs investigués pendant l'étude longitudinale 1 H SRM du cerveau sain vieillissant Profiles neurochimiques ont été acquis à chaque point temporal (table 1) du putamen caudé, cortex cingulaire et le thalamus. Le profile métabolique ainsi comme les temps de relaxation de métabolites ont été mesurés d'un volume plus large (Main) qui consistait primordialement du cortex mais aussi de l'hippocampe et du corps calleux.

3.3 Résultats principaux de l'étude longitudinal <sup>1</sup>H SRM chez le rat vieillissent

Au total, la concentration de 21 différents métabolites ont été déterminés ainsi comme la concentration apparente de <sup>1</sup>H des 4 groupes de résonances de macromolécules pour chaque point temporel comme il est présenté dans le table 3.1. Des mesures des temps de relaxation  $T_1$  de 22 groupes fonctionnelles ainsi

comme le temps de relaxation  $T_2$  de 18 résonances, y compris des résonances présentant du couplage scalaire, ont été mesurés pour la première fois à 17.16 T.

La table 2 présente les concentrations de métabolites et leurs temps de relaxation mesurés dans le volume Main (figure 7) chez les rats à 1 mois d'âge.

L'évolution de la concentration de métabolites principaux sur les quatre régions d'intérêt avec l'âge est présentée dans la figure 8.

Un modèle de régression linéaire à effet mixte a été utilisé pour déterminer l'impact du vieillissement mais aussi du nombre d'examens sur les concentrations et temps de relaxation mesurés. La variable "rat" a été considéré comme un effet aléatoire, permettant ainsi d'analyser les données des cohortes C1 et C2 dans un même test statistique. L'impact de chaque estimateur ainsi comme leur signifiance (P. value) estimés pour les concentrations des métabolites et leur temps de relaxation sont donnés dans les tables 3 et 4.

Les résultats de l'analyse statistique ont montré une augmentation avec l'âge de la glutamine (Gln), Ins and MM dans les 4 régions étudiées. Ces résultats ainsi comme une augmentation du tCho dans la région principal Main, indiquent une possible activation gliale et une neuroinflammation modéré (Chang, et al., 2013). Les biomarqueurs neuronaux NAA et glutamate (Glu) ainsi comme le GABA n'ont pas montré des changements significatifs avec l'âge, sauf pour le cortex cingulaire (CC) où Glu a montré une décroissance avec l'âge. La tCr et le rapport Phosphocreatine (PCr) sur Creatine (Cr) n'ont pas montré des variations majeures, avec uniquement une décroissance de PCr/Cr dans le CC avec l'âge.

Peu de changements du temps  $T_1$  ont eu lieu avec l'âge. Quelques métabolites (NAA, tCho, MM1) ont montré une décroissance de temps de relaxation  $T_2$  avec l'âge. Ces changements suggèrent un modification du milieu cellulaire progressive, notamment par une possible augmentation du fer et du débris protéiques (Marjanska, et al., 2013).

Le nombre des examens passés par les rats ont eu un effet important et inattendu dans les résultats de l'étude. Les régions Main et CC ont présenté des altérations liés au nombre des scans. Vu que ces deux régions avaient les rapports plus élevés de matière grise sur matière blanche, il est possible que le tissue de matière grise soit plus sensible aux stress physiologiques soufferts pendant les examens. L'impact du nombre de scans le plus proéminent a été une augmentation des temps de relaxation  $T_1$  des nombreux métabolites. Cependant, les temps de relaxation de l'eau du tissue n'ont pas montré aucun changement significatif pendant la durée de l'étude.

Les altérations observées associées au nombre de scans sont difficiles à interpréter car , à notre connaissance, ceci est la première fois que de tels effets ont étés observés. Plusieurs facteurs expérimentaux auraient pu avoir un effet persistant au cours de cet étude : 1) l'effet du champ magnétique statique  $B_0$  dont l'impact est encore un sujet de débat (Richard, 2005); 2) une possible augmentation de la température dans le cerveau créée par les champs magnétiques variables ( $B_1$ ), nécessaires pour l'application des impulsions d'inversion courtes dans la séquence LASER ou 3) des effets liés à l'anesthésie par isoflurane, pouvant induire une toxicité hépatique en cas de hypoxie (Van Dyke, 1982; Schieble, et al., 1988; Harper, et al., 1982). Étant donné que ces hypothèses doivent être validés, il est important de considérer leur possibles effets pour des futures études longitudinaux à ultra-haut champ.

Globalement, nos résultats sont cohérents avec une activation gliale modéré liée à l'âge, qui a déjà été rapporté précédemment dans les cerveaux vieillissants humains, de souris et de rat en utilisant soit <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C MRS ou des méthodes histologiques (Cerbai, et al., 2012; Chang, et al., 1996; Boumezbeur, et al., 2010; Duarte, et al., 2014). Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas trouvé des signes clairs de neurodégénérescence ou indiquant un dysfonctionnement mitochondrial.

Métabolites	T <sub>1</sub> (ms)	$R^2$	T <sub>2</sub> (ms)	$R^2$	Concentration (mmol/L)	LICR	Mesures
Ala <sup>a</sup>	-	-	-	-	$1.0 \pm 0.2$	14	12
Asc <sup>b</sup>	$2142 \pm 170$	$0.897 \pm \ 0.040$	-	-	$2.2\pm0.4$	8	12
Asp	$1653 \pm 48$	$0.978 \pm \ 0.012$	$77\pm14$	$0.906\pm0.038$	$2.9\pm0.3$	6	12
Cr <sup>c</sup>	-	-	-	-	$4.1\pm0.4$	4	12
EA	-	-	-	-	$0.6 \pm 0.1$	17	2
GABA	$1643 \pm 36$	$0.971 \pm \ 0.017$	$78\pm20$	$0.960\pm0.012$	$2.0\pm0.3$	6	12
Glc	$1780 \pm 104$	$0.956 \pm \ 0.035$	$170\pm26$	$0.872 \pm 0.044$	$2.2\pm0.6$	6	12
Gln	$1799 \pm 61$	$0.987 \pm \ 0.008$	$58\pm10$	$0.945\pm0.022$	$4.6\pm0.4$	3	12
Glu	$1699 \pm 48$	$0.993 \pm \ 0.004$	$79\pm23$	$0.929 \pm 0.030$	$9.6\pm0.9$	2	12
Gly <sup>b</sup>	$1943 \pm 165$	$0.883 \pm \ 0.075$	-	-	$0.2\pm0.04$	16	6
GPC	$1412 \pm 75$	$0.953 \pm \ 0.033$	$220\pm32$	$0.930\pm0.029$	$0.6 \pm 0.1$	5	12
GSH	$1658\pm341$	$0.905 \pm \ 0.059$	$105\pm39$	$0.839\pm0.066$	$1.0\pm0.1$	10	12
Ins	$1608 \pm 34$	$0.995 \pm \ 0.002$	$170\pm15$	$0.948\pm0.025$	$5.9\pm0.6$	2	12
Lac	$1766 \pm 184$	$0.966 \pm \ 0.026$	$121\pm26$	$0.827\pm0.092$	$1.6 \pm 0.3$	6	12
NAA(CH <sub>3</sub> )	$1810\pm64$	$0.993 \pm \ 0.004$	$226\pm26$	$0.938\pm0.042$	$9.2\pm0.7$	1	12
NAA(CH <sub>2</sub> )	$1527 \pm 48$	$0.981 \pm \ 0.009$	$172 \pm 14$	$0.939\pm0.022$	-	-	-
NAA(CH)	$1967 \pm 188$	$0.885 \pm \ 0.053$	$182\pm22$	$0.876 \pm 0.043$	-	-	-
NAAG	$1510 \pm 55$	$0.939 \pm \ 0.034$	-	-	$0.8 \pm 0.1$	7	12
PCh	$1413 \pm 71$	$0.950 \pm \ 0.033$	$204\pm31$	$0.930\pm0.027$	$0.3\pm0.1$	7	12
PCr <sup>c</sup>	-	-	-	-	$4.9\pm0.3$	3	12
$\rm PE^{b}$	$1868 \pm 109$	$0.975 \pm \ 0.007$	-	-	$1.7\pm0.2$	9	12
Ser <sup>a</sup>	-	-	-	-	$1.0 \pm 0.2$	20	5
Tau	2211 ± 94	$0.990 \pm \ 0.003$	$118 \pm 5$	$0.950\pm0.017$	$5.5\pm0.5$	3	12
tCho	$1408 \pm 67$	$0.954 \pm \ 0.033$	$212\pm21$	$0.919\pm0.049$	$0.9\pm0.2$	4	12
tCr(CH <sub>3</sub> )	$1753 \pm 60$	$0.995 \pm \ 0.002$	$141 \pm 7$	$0.981\pm0.009$	$8.9\pm0.6$	1	12
tCr(CH <sub>2</sub> )	$1203 \pm 45$	$0.946 \pm \ 0.010$	$132\pm10$	$0.927\pm0.023$	-	-	-
tNAA <sup>c</sup>	$1786 \pm 55$	$0.997 \pm \ 0.002$	$218\pm17$	$0.935\pm0.025$	$9.9\pm0.7$	1	12
Groupes MM	$T_1(ms)$	$\mathbf{R}^2$	T <sub>2</sub> (ms)	$\mathbb{R}^2$	Concentration <sup>1</sup> H (mmol/L)	LICR	Mesures
MM1	748 ± 14	$0.962 \pm 0.013$	20 ± 2	$0.994 \pm 0.003$	$170.1 \pm 14.1$	2	12
MM2	$652 \pm 41$	$0.977 \pm 0.020$	$28 \pm 3$	$0.980\pm0.008$	$114.4 \pm 8.6$	3	12
MM3	$574 \pm 22$	$0.971 \pm 0.012$	55 ± 5	$0.931 \pm 0.055$	$26.6\pm2.8$	5	12
MM4	792 ± 39	$0.948 \pm 0.021$	43 ± 6	$0.959 \pm 0.013$	82.5 ± 5.8	4	12

Table 2. Résumé des concentrations absolues et des temps de relaxation chez les jeunes rats à 17,2 T Les temps de relaxation et les concentrations des métabolites et des groupes MM des rats âgés de 1 mois mesurés sur le VOI Main (moyenne  $\pm$  écart type). Pour évaluer la qualité des estimations de temps de relaxation T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> les coefficients de détermination (R<sup>2</sup>) sont présentés. Les LICRs moyens sont présentés également. Les concentrations de <sup>1</sup>H des MM a été référencé à l'intégrale de la Cr. Le nombre des fois où un métabolite a été détecté sur 12 est montré.

<sup>a</sup> Le temps de relaxation moyenne des métabolites a été considéré pour la quantification.

<sup>b</sup> Le temps  $T_2$  moyen a été considéré pour la quantification.

<sup>c</sup> Le temps  $T_1$  et  $T_2$  de la résonance méthyl a été prise pour la quantification.



■C1:1 ■C1:4 ■C1:7 ■C2:8 ■C2:11 ■C1:12 ■C2:14 ■C2:18

Figure 8. Changements métaboliques dans le cerveau du rat vieillissant sur 4 VOIs. Les concentrations moyennes sont présentées avec leurs écarts-types par des barres d'erreur pour les différents points temporels pour les cohortes C1( couleurs vertes , âges à 1 , 4, 7 et 12 mois) et C2 (couleurs bleues , âges à 8, 11,14, 18). Des corrections identiques pour la pondération  $T_1$  et  $T_2$  ont été appliqués sur les 4 VOIs pour chaque point temporel. \* MM1 est exprimée en unités de <sup>1</sup>H mmol/L.

	Main			Thalamus				Putamen Caudé				Cingulate Cortex				
	Âg	ge	Exan	nens	Âg	ge	. Exa	nens	Âg	ge	Exan	nens	Âg	ge	Exan	nens
	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value	Change (%)	P. Value
Ala	0.87	0.196	0.04	0.989	-0.22	0.790	1.62	0.663	0.39	0.806	-4.05	0.507	-0.52	0.592	4.70	0.288
Asc	-0.88	0.271	10.77	0.005	-0.58	0.684	15.03	0.033	0.36	0.846	-8.43	0.319	-2.38	0.104	11.83	0.090
Asp	-0.20	0.781	1.96	0.483	-0.34	0.640	1.60	0.585	-0.62	0.447	2.78	0.458	-1.43	0.095	7.47	0.060
Cr	0.60	0.170	1.32	0.433	0.02	0.972	-0.11	0.957	0.53	0.452	1.86	0.501	1.59	0.130	-2.45	0.572
Cr/PCr	0.59	0.359	0.92	0.719	-0.04	0.947	-1.37	0.612	0.40	0.723	2.07	0.641	3.35	0.021	-15.16	0.024
GABA	0.63	0.265	-5.64	0.015	-0.71	0.245	-4.63	0.108	0.33	0.663	-3.14	0.363	-1.16	0.211	2.50	0.513
Glc	-0.88	0.398	-7.76	0.060	-0.44	0.696	-4.62	0.327	0.41	0.808	-3.31	0.638	-2.24	0.085	1.51	0.793
Gln	1.70	0.008	-4.54	0.043	1.05	0.066	2.21	0.347	0.72	0.229	2.18	0.422	0.28	0.716	3.11	0.321
Glu	-0.37	0.262	0.86	0.510	-0.39	0.320	2.99	0.105	-1.27	0.056	5.11	0.059	-1.41	0.018	8.43	0.001
Glu/Gln	-1.75	0.025	4.31	0.111	-1.21	0.052	0.78	0.749	-1.76	0.018	2.59	0.431	-1.61	0.033	5.06	0.087
GPC	1.18	0.012	5.05	0.020	0.18	0.756	-1.35	0.586	0.38	0.639	3.74	0.310	0.71	0.523	2.41	0.623
GSH	0.94	0.105	-0.63	0.781	0.84	0.221	0.16	0.954	0.14	0.852	-0.18	0.959	0.12	0.914	-3.46	0.489
Ins	1.40	0.002	2.30	0.114	0.72	0.065	-1.36	0.454	1.95	< 0.001	-0.03	0.990	0.72	0.350	2.36	0.461
Lac	1.65	0.363	6.57	0.371	0.89	0.478	-4.06	0.461	0.60	0.809	7.97	0.421	5.65	0.134	15.36	0.375
NAA	0.39	0.107	-1.81	0.074	-0.16	0.652	-0.09	0.956	-0.36	0.478	2.33	0.263	-0.81	0.051	5.55	0.002
NAAG	2.04	0.003	-8.06	0.001	-0.40	0.605	4.33	0.226	0.73	0.470	-4.98	0.279	-0.14	0.867	1.00	0.799
PCh	0.95	0.078	6.69	0.008	-0.11	0.845	-0.51	0.828	0.69	0.401	2.23	0.551	0.59	0.620	3.56	0.502
PCr	0.19	0.709	-0.05	0.980	0.14	0.806	0.92	0.695	0.07	0.914	-0.12	0.962	-1.68	0.025	9.76	0.006
PE	-0.32	0.428	1.96	0.303	-0.17	0.777	0.18	0.946	-0.16	0.728	1.07	0.601	-1.48	0.066	10.95	0.001
Tau	-0.04	0.938	1.26	0.487	-0.87	0.477	4.23	0.420	-0.50	0.373	-0.43	0.866	-0.08	0.896	0.31	0.917
tCho	1.16	0.015	5.39	0.016	0.12	0.832	-1.21	0.615	0.53	0.499	3.06	0.396	0.72	0.529	2.63	0.599
tCr	0.37	0.291	0.62	0.634	0.11	0.783	0.50	0.759	0.25	0.452	0.73	0.586	-0.24	0.559	4.37	0.023
tNAA	0.51	0.027	-2.29	0.016	-0.19	0.608	0.34	0.836	-0.29	0.546	1.71	0.402	-0.77	0.018	5.21	0.001
MM1	1.70	< 0.001	-3.18	0.002	1.68	< 0.001	-2.71	0.137	0.64	0.172	0.56	0.791	1.19	0.014	-1.64	0.387
MM2	0.68	0.113	4.44	0.014	1.39	0.008	0.61	0.796	0.46	0.355	3.77	0.103	1.29	0.040	-0.19	0.940
MM3	0.36	0.463	6.13	0.005	1.08	0.050	2.03	0.424	0.04	0.939	5.23	0.052	0.64	0.362	2.85	0.341
MM4	0.75	0.106	-2.27	0.217	0.85	0.202	-1.90	0.484	0.63	0.403	-3.75	0.279	1.63	0.040	-8.28	0.025

Table 3. Variations de concentration de métabolites avec l'âge et le nombre d'examens comme prédicteurs.

Les résultats de l'analyse du modèle de régression linéaire sur les concentrations absolues de métabolites en utilisant l'âge et le nombre d'examens comme prédicteurs sont montrés. Chaque région a été analysée de façon indépendante. Le changement normalisé par chaque prédicteur est affichée avec sa valeur P. associé.

	Ter	nps de R	elaxation 7	$\Gamma_1$	Temps de Relaxation T <sub>2</sub>				
	Âg	e	Exam	nens	Âg	e	Exam	ens	
	Change (%)	p-value	Change (%)	p-value	Change (%)	p-value	Change (%)	p-value	
Asc	0.16	0.754	-4.21	0.057	-	-	-	-	
Asp	-0.28	0.108	3.08	< 0.001	1.13	0.147	-0.86	0.800	
GABA	0.69	0.017	3.68	0.006	0.41	0.722	2.88	0.587	
Glc	-0.29	0.571	4.18	0.051	8.42	0.304	26.31	0.374	
Gln	-0.57	0.024	3.34	0.001	-0.52	0.404	1.85	0.567	
Glu	0.06	0.603	2.59	< 0.001	1.02	0.130	-1.30	0.707	
Gly	1.45	0.387	4.51	0.645	-	-	-	-	
GPC	-0.32	0.190	1.42	0.142	-1.55	0.008	2.52	0.385	
GSH	0.53	0.329	-0.97	0.701	-0.13	0.822	2.52	0.387	
Ins	-0.12	0.357	1.37	0.019	-0.30	0.455	-2.48	0.235	
Lac	0.87	0.329	-1.09	0.810	1.34	0.399	-11.29	0.177	
NAA(CH <sub>3</sub> )	-0.08	0.647	2.88	< 0.001	-0.81	0.045	2.82	0.118	
NAA(CH <sub>2</sub> )	0.35	0.087	1.76	0.059	0.36	0.382	2.24	0.199	
NAA(CH)	-0.10	0.856	9.99	0.001	0.07	0.910	2.94	0.321	
NAAG	-0.53	0.105	4.19	0.015	-3.48	0.217	-8.64	0.424	
PCh	-0.18	0.466	1.40	0.154	-1.05	0.091	0.79	0.805	
PE	-0.02	0.929	1.97	0.103	-	-	-	-	
Tau	0.09	0.604	1.80	0.056	0.63	0.137	-4.67	0.038	
tCho	-0.23	0.233	1.35	0.131	-1.55	0.049	2.95	0.379	
tCr(CH <sub>3</sub> )	0.17	0.316	2.45	0.001	-0.33	0.234	0.66	0.563	
tCr(CH <sub>2</sub> )	0.27	0.118	0.71	0.420	-0.30	0.395	-6.57	0.001	
tNAA(CH <sub>3</sub> )	-0.17	0.281	2.72	< 0.001	-0.95	0.018	2.29	0.177	
Eau Tissue	0.03	0.842	0.63	0.443	0.50	0.383	-1.00	0.709	
MM1	0.13	0.293	1.02	0.055	-0.68	0.029	1.90	0.230	
MM2	0.33	0.120	2.22	0.044	-0.18	0.721	-3.79	0.080	
MM3	-0.83	0.481	0.20	0.972	-0.06	0.886	-6.91	0.002	
MM4	0.29	0.167	1.05	0.332	-0.45	0.368	1.83	0.488	

Table 4. Variations de temps de relaxation avec l'âge et le nombre d'examens

Les résultats de l'analyse du modèle de régression linéaire sur les temps de relaxation de métabolites en utilisant l'âge et le nombre d'examens comme prédicteurs sont montrés. Le changement normalisé par chaque prédicteur est affichée avec sa valeur P. associé. Les données ont été acquises dans le VOI Main.

# 4. ETUDE QUANTITATIVE PRELIMINAIRE PAR <sup>31</sup>P SRM dans le cerveau de rat pendant le vieillissement

<sup>31</sup>P SMR permet d'étudier le métabolisme énergétique du cerveau *in vivo* en mesurant directement des composés phosphatés de haute énergie clés, tels que l'adénosine-triphosphate (ATP) et la phosphocréatine (PCr). En outre, il y a un intérêt croissant pour l'étude des altérations des phosphomonoesters (EMP) et des phosphodiesters (PDE) dans des maladies neurodégénératives ou psychiatriques (Mecheri, et al., 1997; Wijnen, et al., 2010). De même pour le travail présenté dans le chapitre 3, l'objectif principal de cet étude en <sup>31</sup>P SMR a été d'implémenter une méthode de quantification in vivo à 17,2 T chez le cerveau vieillissant du rat. Trois cohortes de rats DA à 5, 17 et 21 mois d'âge ont été inclues dans cette étude. Les profils métaboliques <sup>31</sup>P ont été acquis avec une séquence FID-OVS en utilisant BISTRO comme méthode de localisation (figure 9). La décomposition spectrale a été effectué dans le domaine fréquentiel en utilisant LCModel (Provencher, 1993; Deelchand, et al., 2012) et la quantification a été accomplie en utilisant l'eau du tissu cérébral en tant que référence de concentration tel que il a été proposé par Bottomley *et al* avec l'utilisation d'un factor de correspondance liée à la sensibilité du noyau proton et phosphore de l'antenne utilisé à double noyau (Bottomley, et al., 1996). Mise à part la publication récente par Deelchand et al(Deelchand, et al., 2015), LCModel n'avait pas été utilisé auparavant pour l'analyse des spectres <sup>31</sup>P et des paramètres cachés du logiciel ont du être adaptés (Henry, et al., 2003; Deelchand, et al., 2012). Les détails sur ces paramètres sont donnés dans le manuscrit en anglais de cette thèse. En outre, les temps de relaxation  $T_1$  des métabolites phosphorylés ont été mesurés en utilisant la méthode d'inversion-récupération.



Figure 9. Définition du VOI mésuré par <sup>31</sup>P SRM par des bandes BISTRO

8 bandes OVS BISTRO placés manuellement ont été utilisées pour saturer la contribution du signal provenant de l'extérieur du cerveau. Le positionnement a été fait à partir d'images pondérés  $T_2$  (axial) et des images « scout » pondérées  $T_2^*$  (sagittal, coronal).

### 4.1 Resultats principaux de l'etude ${}^{31}$ P SRM chez le rat vieillissent

Les temps de relaxation  $T_1$  mesurés sur 8 rats sont montrés dans la table 5. Les concentrations des métabolites estimés sur différents groupes d'âge sont présentées sur la table 6.

Dans cette étude, les valeurs de concentration qui ont été trouvés sont en accord aux résultats publiés (table 6). Cependant, les concentrations de glycerophosphocholine (GPC), glycerophosphoethalonamine (GPE), glucose-1-phosphate et l'ATP ont été sous-estimée. En particulier, notre rapport [ATP $\gamma$ ] / [PCr] de 0,26 a été plus faible que les valeurs trouvés chez le cerveau du chien (0,45), de la souris (0,71) ou chez l'humain (0,51 à 1,27) (Hetherington, et al., 2001; Jensen, et al., 2002; Mlynàrik, et al., 2012; Erecinska, et al., 1989). La correction de pondération T<sub>1</sub> a été appliquée à tous les métabolites sur la base des temps T<sub>1</sub> calculées (table 5). Les corrections PCr et ATP $\gamma$  correspondent à une augmentation du signal de 15% et 2% par rapport aux valeurs non corrigées, respectivement. Notre faible rapport ATP / PCr pourrait être associée à une augmentation de la pondération T<sub>2</sub> (ou T2 \*) différente entre l'ATP et la PCr, comme il a déjà été observé à de faibles champs magnétiques (Brooks, et al., 1986) et c'est un effet pour lequel aucune correction a été appliqué dans cet étude.

Les concentrations mesurées avec <sup>31</sup>P SRM on été en bon accord avec les concentrations de métabolites trouvés dans la région Main mésures par <sup>1</sup>H SRM comme montrée dans la table 2. La GPC, PCr et PCh ont montré des différences relatives entre les deux études de 22, 4 et 27 % respectivement. La concentration en phosphoethalonamine (PE) mesurée en <sup>31</sup>P (0,87 mM) est la moitié de celle trouvée dans les études en <sup>1</sup>H (1,7 mM), présentant des valeurs LICRs similaires dans les deux noyaux (8 % et 9 % pour le l'analyse <sup>31</sup>P et <sup>1</sup>H, respectivement). Néanmoins, les deux concentrations de la PE sont compatibles avec leurs diverses concentrations signalées soit dans les études <sup>1</sup>H ou <sup>31</sup>P (Blüml, et al., 1999; Smart, et al., 1994). La différence relative peut provenir de la différence entre les deux VOI mais aussi de l'inexactitude de certains de nos facteurs de correction (pondération T<sub>1</sub>, atténuation de l'artefact de déplacement chimique)

Le présent ouvrage souligne les principaux défis sur la quantification des métabolites phosphorylés par <sup>31</sup>P SRM dans le cerveau de rat, notamment l'impact de la méthode de quantification et de l'artefact de déplacement chimique.

Jusqu'à 12 métabolites ont été quantifiés à l'aide LCModel et les temps de relaxation  $T_1$  de 10 différentes résonances ont été estimés. Dans l'avenir, l'approche présentée peut être facilement utilisé pour d'autres montages expérimentaux. Notamment, la mise en oeuvre du régime de BISTRO ouvre la voie pour des expériences de transfert de saturation, en particulier pour la mesure de la vitesse de synthèse de l'ATP, comme cela a été fait dans le modèle de souris de la maladie d'Alzheimer à 14,1 T(Mlynàrik, et al., 2012).

	GPC	GPE	Glc6P	PE	PCr	NADH	Pi	PCh	$ATP_{\alpha}$	$ATP_{\gamma}$
T <sub>1</sub> (ms)	$1080\pm210$	1170	$1030 \pm 185$	$1000\pm275$	$1010\pm210$	1800	1110	$1160 \pm 140$	$280\pm70$	$390\pm100$
R <sup>2</sup>	$0.78\pm0.13$	0.64	$0.79\pm0.12$	$0.84\pm0.1$	$0.95 \pm 0.02$	0.69	0.86	$0.87\pm0.09$	$0.72\pm0.10$	$0.77\pm0.04$
Mesures <sup>a</sup>	5	1	7	3	8	1	1	3	3	5

Table 5. Temps de relaxation  $T_1$  de métabolites <sup>31</sup>P chez le cerveau de rat *in vivo* à 17,2 T.

Les données provenant des rats de tous âges ont été regroupées. Résultats LCModel présentant des LICR > 25 % ont été rejetés.

<sup>a</sup> Seuls les résultats montrant un un coefficient de détermination supérieur à 0,6 ont été considérés.

	5 Mois	17 Mois	21 Mois	Tous	Corrigés	Mesures <sup>a</sup>	LICR	Littérature
Gly1P	$0.33\pm0.14$	$0.30\pm0.04$	-	$0.32\pm0.11$	$0.29\pm0.10$	6	20	-
GPC	$0.74\pm0.31$	$0.73\pm0.23$	$0.51\pm0.14$	$0.70\pm0.26$	$0.73\pm0.27$	18	7	<u>0.6, 1</u> .05-1.14 <sup>H</sup>
GPE	$0.26\pm0.10$	$0.28\pm0.11$	$0.19\pm0.02$	$0.25\pm0.10$	$0.27\pm0.10$	17	17	$0.74-0.83^{H}$
F6P	$0.29\pm0.16$	-	-	$0.29\pm0.16$	$0.26\pm0.15$	3	22	0.012, 0.050
Glc1P	$0.19\pm0.05$	$0.25\pm0.15$	0.22	$0.23\pm0.12$	$0.23\pm0.12$	9	20	0.02
Glc6P	$0.06\pm0.12$	$0.06\pm0.10$	-	$0.05\pm0.10$	$0.20\pm0.06$	4	21	$0.09, 0.19, 0.8^{\rm H}$
PE	$0.97\pm0.39$	$1.09\pm0.30$	$0.69\pm0.06$	$0.97\pm0.34$	$0.87\pm0.30$	18	8	$1.7, 1.0-20., 0.5-1^{H}$
PCr	$4.87 \pm 1.90$	$4.29 \pm 1.17$	$3.06 \pm 1.18$	$4.34 \pm 1.60$	$5.08 \pm 1.87$	18	2	$\underline{4.9}, 4-5.5, 2.4-5^{H}$
NADH	$0.13\pm0.05$	$0.12\pm0.06$	$0.08\pm0.02$	$0.11\pm0.06$	$0.26\pm0.13$	11	18	0.36 <sup>H</sup>
Pi	$0.73\pm0.33$	$0.71\pm0.23$	$0.53\pm0.10$	$0.69\pm0.27$	$0.68\pm0.26$	18	9	0.94 <sup>H</sup> , 1.63-2.8
PCh	$0.44\pm0.19$	$0.42\pm0.14$	$0.26\pm0.07$	$0.40\pm0.16$	$0.38\pm0.16$	18	9	$0.3, 0.46^{H}$
$ATP_{\alpha}$	$0.54\pm0.24$	$0.72\pm0.21$	$0.38\pm0.24$	$0.59\pm0.25$	$0.90\pm0.38$	18	11	-
$ATP_{\gamma}$	$1.21\pm0.57$	$1.19\pm0.39$	$0.73\pm0.27$	$1.12\pm0.48$	$1.30\pm0.56$	18	7	$2.3-3.3, 2.19-3.8^{H}$
Pi/PCr	0.15	0.16	0.18	0.16	0.14	-	-	0.27-0.53, 0.32
ATP <sub>γ</sub> /PCr	0.24	0.27	0.25	0.25	0.26	-	-	0.45-0.71,0.51-1.27 <sup>H</sup>

Table 6. Concentrations <sup>31</sup>P SRM des métabolites et des ratios à 17,2 T dans le cerveau de rat *in vivo*. Concentrations de métabolites (mM) sont indiqués pour les cohortes de rats à 5 ans, 17 et 21 mois et ainsi que leurs données regroupées. Les concentrations totales corrigés pour leur pondération  $T_1$  et de l'artefact de déplacement chimique sont montrés aussi. Les temps de relaxation  $T_1$  indiquées dans le tableau 5 ont été utilisés pour la correction de pondération  $T_1$  et les valeurs de la PCr ont été utilisées pour Gly1P, F6P et Glc1P. Les rapports de métabolites ont été calculés pour chaque spectre individuel avant moyenner. <sup>a</sup> Détection d'un métabolite avec LICR en dessous 25 parmi les 18 spectres SRM.

<sup>H</sup> valeurs retrouvés sur des études du cerveau humain (Zhu, et al., 2012; Hetherington, et al., 2001; Zhu, et al., 2015; Jensen, et al., 2002; Blüml, et al., 1999). D'autres valeurs ont été signalés dans les études chez les rongeurs (Plaschke, et al., 1993; Mans, et al., 1994; Erecinska, et al., 1989; Mlynàrik, et al., 2012; Smart, et al., 1994). Les valeurs soulignées sont celles mesurées en utilisant <sup>1</sup>H SRM (table 2).

# PARTIE III: IMAGERIE SPECTROSCOPIQUE A 7 T

# 6. ${}^{1}H \text{ et } {}^{31}P \text{ ISRMN}$ dans le cerveau humain a 7 T

Dans ce chapitre, un module de suppression optimisée d'eau WET (Ogg, et al., 1994) et un module OVS BISTRO ont été évalués à 7 T. À cette fin, une séquence CSI 2D avec localisation STEAM (CSI-ST) a été utilisé pour l'acquisition de données <sup>1</sup>H SRM et pour comparer des modules WET. Des cartes métaboliques <sup>31</sup>P ont également été acquises en utilisant une séquence 2D CSI-FID, en utilisant soit des bandes OVS standard ou BISTRO.

#### 6.1. Evaluation du module de suppression d'eau WET

Figure 10 montre le signal de l'eau résiduelle pour deux jeux de données <sup>1</sup>H CSI-ST acquis sur deux volontaires en utilisant soit le système de suppression d'eau par défaut (10a) ou le module de suppression de l'eau optimisée numériquement (10b). Les spectres correspondant à la même position par rapport à la VOI sont présentés. L'efficacité de suppression a été estimée pour les 5 régions indiquées en calculant le rapport entre la valeur maximale atteinte par la résonance de l'eau résiduelle et celle du NAA(CH<sub>3</sub>). Ratios de 218  $\pm$  150 et 27  $\pm$  25 ont été trouvés respectivement pour le WET avec paramétrage par défaut et avec des paramètres numériquement optimisés. Cela correspond à une amélioration moyenne de l'efficacité de suppression par un facteur de 8,8.



Figure 10. Efficacité de la suppression de l'eau WET évaluée in vivo à 7 T

A. Distribution d'eau résiduelle et (C) spectres <sup>1</sup>H en utilisant le module WET du constructeur. B. Distribution d'eau résiduelle et (D) spectres <sup>1</sup>H des métabolites en utilisant le module WET optimisé. Les spectres dans chaque colonne ont la même échelle et ils ont été corrigés pour leur phase d'ordre zéro. Les spectres dans la colonne (C) ont aussi été corrigés pour la phase de premier ordre. (A, B) Les cercles affichés correspondent au contour de la fonction d'étalement de point (FEP) à 64% de l'intensité maximale de la FEP.

#### 6.2. Evaluation des bands OVS

Figure 11 montre une carte <sup>31</sup>P du signal de la PCr acquise avec une seule bande BISTRO en utilisant des impulsions AFP hyperbolique sécantes HS8 (Garwood, et al., 2011), positionné dans une région où le profil du champ d'excitation  $B_1$  était le plus inhomogène. Autant la carte de PCr comme les spectres <sup>31</sup>P démontrent l'efficacité de suppression du signal par BISTRO. Pourtant, le besoin d'appliquer des impulsions RF avec des puissances élevées n'ont pas permis l'application de plus d'une bande de BISTRO pour un TR de 2,3 s.

L'application d'une seule impulsion HS8 dans une band OVS classique a montré des résultats satisfaisants (Figure 12). Une réduction du signal de PCr d'un facteur de environ 8 a été trouvée entre le spectre #1 et le spectre opposé non-supprimé #3. Avec deux bandes OVS adiabatiques, la limite du dépôt d'énergie était au maximum pour un TR=2.3 s.

### 6.3. Carte du signal des métabolites par <sup>31</sup>P ISRMN

Les cartes de signaux des métabolites <sup>31</sup>P présentés dans la figure 13 ont été générées avec le logiciel CSIAPO (Le Fur, et al., 2010) et elles ont été obtenues avec deux bandes OVS adiabatiques. Des spectres correspondant à des régions contenant majoritairement de la matière blanche (#1) ou de la matière grise (#2) sont présentés (figure 13B). Trois spectres qui correspondent aux moyennes du cortex frontal (#3), du cortex occipital (#4) et du superiori corona radiata (#5) sont aussi présentés (Wakana, et al., 2004). Les résultats des examens chez le volontaire ont souvent montré une variabilité de l'intensité du signal dans l'aire frontale du cerveau, probablement du aux différences de sensibilité de l'antenne et à une réduction de l'angle de bascule effectif par rapport à l'arrière de la tête, où les antennes sont plus proches au cerveau et perçoivent une moindre variation de la charge entre différents sujets.



Figure 11. Efficacité d'une band BISTRO pour la suppression du signal <sup>31</sup>P dans le cerveau humain à 7 T. A. Distribution de la PCr dans le cerveau sous l'application d'une bande de BISTRO utilisant des impulsions RF hyperboliques sécantes HS8. B. Spectres correspondant aux régions marquées dans A. Le spectre #1 ne montre aucun signal résiduel au-dessus du niveau de bruit. Les spectres ont été mis à la même échelle et des corrections de phase d'ordre zéro- et de premier ordre ont été appliquées. Les cercles superposés correspondent au contour de la fonction d'étalement de point (FEP) à 64% de l'intensité maximale FEP.



Figure 12 Efficacité d'une seul band OVS avec une impulsion adiabatique.

A. Distribution du signal de la PCr dans le cerveau avec une bande OVS appliquée sur un côté du crâne. La bande OVS composée d'une seule impulsion de saturation hyperbolique sécante HS8. B. Spectres des régions marquées sur la carte PCr. Une nette diminution peut être observée entre le spectre #1 et les deux autres spectres, montrant une bonne efficacité de suppression. Les spectres ont été mis à la même échelle et des corrections de phase d'ordre zéro- et de premier ordre ont été appliquées. Les cercles superposés correspondent au contour de la fonction d'étalement de point (FEP) à 64% de l'intensité maximale FEP.



Figure 13. Cartes de distribution des métabolites <sup>31</sup>P acquises *in vivo* dans le cerveau humain à 7 T. A. Image de référence montrant les bandes d'OVS adiabatique et les ROI utilisés. B. Spectres contenant principalement de la matière grise (#1) et de la matière blanche (#2) ainsi comme une moyenne sur le cortex frontale (#3), cortex occipital (#4) et du superiori corona radiata (#5). C. Cartes du signal <sup>31</sup>P de métabolites superposés avec une image anatomique. Les spectres ont été mis à la même échelle et des corrections de phase d'ordre zéro- et de premier ordre ont été appliquées.

### BIBLIOGRAPHIE

Almkvist, O, LO Wahlund, G Andersson-Lundman, H Basun, et J Bäckman. «Whitematter hyperintensity and neuropsychological functions in dementia and healthy aging.» *Arch Neurol* 49, 1992: 626-632.

Alzheimer's Association. «2013 Alzheimer's disease facts and figures.» Alzheimer's & Dementia 9, 2013: 208-245.

- Behar, Kevin L, Douglas L Rothman, Dennis D Spencer, et Ognen AC Petroff. «Analysis of macromolecule resonances in 1H NMR spectra of human brain.» *Magn Reson Med* 32, 1994: 294-302.
- Behar, KL, et T Ogino. «Characterization of macromolecule resonances in the 1H NMR spectrum of rat brain.» *Magn Reson Med* 30, 1993: 38-44.
- Blüml, S, KJ Seymour, et BD Ross. «Developmental changes in choline- and ethalonamine-containing compounds measured with proton-decoupled (31)P MRS in in vivo human brain.» *Magn Reson Med* 42, 1999: 643-654.
- Bottomley, Paul A, Ergin Atalar, et Robert G Weiss. «Human cardiac high-energy phosphate metabolite concentrations by 1Dresolved NMR spectroscopy.» *Magn Reson Med 35*, 1996: 664-670.
- Boumezbeur, Fawzi, et al. «Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy.» *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 2010: 211-221.
- Brand, A, C Richter-Landsberg, et D Leibfritz. «Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells.» Dev Neurosci 15, 1993: 289-298.
- Brooks, WM, J Field, MG Irving, et DM Doddrell. «In vivo determination of 31P spin relaxation times (T1, T2, T1 rho) in rat leg muscle. Use of an off-axis solenoid coil.» *Magn Reson Imaging 4*, 1986: 245-250.
- Busse, EW. «Hypochondriasis in the elderly.» Compr. Ther. 13, 1987: 37-42.
- Cerbai, Francesca, et al. «The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus.» *PLoS ONE* 7, 2012: e45250.
- Chang, L, T Ernst, RE Poland, et DJ Jeden. «In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the normal aging human brain.» *Life Sci* 58, 1996: 2049-2056.
- Chang, Linda, Sody M Munsaka, Stephanie Kraft-Terry, et Thomas Ernst. «Magnetic resonance spectroscopy to assess neuroinflammation and neuropathic pain.» J Neuroimmune Pharmacol 8, 2013: 576-593.
- Charles, HC, et al. «Proton spectroscopy of human brain: effects of age and sex.» *Prog Neuropsychopharmocol Biol Psychiatry* 18, 1994: 995-1004.
- Comas-Herrera, A, R Wittenberg, L Pickard, et M Knapp. «Cognitive impairment in older people: future demand for long-term care services and the associated costs.» *Int J Geriatr Psychiatry* 22, 2007: 1037-1045.
- Coutu, Jean-Philippe, J Jean Chen, H Diana Rosas, et David H Salat. «Non-Gaussian water diffusion in aging white matter.» *Neurobiol Aging 35*, 2014: 1412-1421.
- Davie, CA, et al. «Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions.» Brain 117, 1994: 49-58.
- de Graaf, Robin A. In Vivo NMR Spectroscopy 2nd Edition: Principles and Techniques. The Atrium: John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- de Graaf, Robin A, Peter B Brown, Scott McIntyre, Terence W Nixon, Kevin L Behar, et Douglas L Rothman. «High Magnetic Field Water and Metabolite Proton T1 and T2 Relaxation in Rat Brain In Vivo.» *Magn Reson Med 56*, 2006: 386-394.
- Deelchand, Dinesh Kumar, Tra My Nguyen, Fanny Mochel, et Pierre-Gilles Henry. «Quantification of 31P NMR spectra using LCModel.» *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the ISMRM*. Melbourne, Australia: ISMRM, 2012. 4395.
- Deelchand, DK, TM Nguyen, XH Zhu, F Mochel, et PG Henry. «Quantification of in vivo 31 P NMR brain spectra using LCModel.» *NMR Biomed*, 2015: 9 pgs.
- Duarte, João MN, Kim Q Do, et Rolf Gruetter. «Longitudinal neurochemical modifications in the aging mouse brain measured in vivo by 1H magnetic resonance spectroscopy.» *Neurobiol Aging 35*, 2014: 1660-1668.
- Duijn, JH, GB Matson, AA Maudsley, JW Hugg, et MW Weiner. «Human brain infarction: proton MR spectroscopy.» *Radiol* 183, 1992: 711-718.
- Ellis, CM, et al. «Changes in putamen N-acetylaspartate and choline ratios in untreated and levodopa-treated Parkinson's disease: a proton magnetic resonance spectroscopy study.» *Neurol* 49, 1997: 438-444.
- Erecinska, Maria, et Ian A Silver. «ATP and Brain Function.» J Cereb Blood Flow Metab 9, 1989: 2-19.
- Esposito, G, BS Kirkby, JD van Horn, TM Ellmore, et KF Berman. «Context-dependent, neural system-specific neurophysiological concomitants of ageing: mapping PET correlates during cognitive activation.» *Brain 122*, 1999: 963-979.
- Floyd, RA, et K Hensley. «Oxidative stress in brain ageing. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases.» *Neurobiol Ageing 23*, 2002: 795-807.

- Frahm, Jens, Klaus-Dietmar Merboldt, et Wolfgang Hänicke. «Localized proton spectroscopy using stimulated echoes.» J Magn Reson 72, 1987: 502-508.
- Garwood, Michael, et Lance DelaBarre. «The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR.» J Magn Reson 153, 2011: 155-177.
- Haga, Kristin K, Yuet Peng Khor, Andrew Farrall, et Joanna M Wardlaw. «A systematic review of brain metabolite changes, measured with 1H magnetic resonance spectroscopy, in healthy aging.» *Neurobiol Aging 30*, 2009: 353-363.
- Hahn, EL. «Spin echoes.» Phys Rev 80, 1950: 580-594.
- Harman, D. «Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.» J Gerontol 11, 1956: 298-300.
- Harper, MH, P Collins, B Johnson, EI 2nd Eger, et C Biava. «Hepatic injury following halothane, enflurane, and isoflurane anesthesia in rats.» *Anesthesiology* 56(1), 1982: 14-17.
- Henning, Anke, Alexander Fuchs, James B Murdoch, et Peter Boesiger. «Slice-selective FID acquisition, localized by outer volume suppression (FIDLOVS) for 1H-MRSI of the human brain at 7T with minimal signal loss.» NMR Biomed 22, 2009: 683-696.
- Henry, Pierre-Gilles, Gülin Öz, Stephen Provencher, et Rolf Gruetter. «Toward dynamic isotopomer analysis in the rat brain in vivo: automatic quantitation of 13C NMR spectra using LCModel.» *NMR Biomed 16*, 2003: 400-412.
- Hetherington, HP, DD Spencer, JT Vaughan, et JW Pan. «Quantitative 31P spectroscopic imaging of human brain at 4 Tesla: Assessment of gray and White Matter differences of phosphocreatine and ATP.» Magn Reson Med 45, 2001: 46-52.
- Heun, R, S Schlegel, et M Graf-Morgenstern. «Proton magnetic resonance spectroscopy in dementia of Alzheimer type.» *Int J Geriat Pychiatry 12*, 1997: 349-358.
- Hoult, David I, et D Phil. «Sensitivity and Power Deposition in a High-Field Imaging Experiment.» J Magn Reson Imag 12, 2000: 46-67.
- Hoyert, DL, HC Kung, et BL Smith. «Deaths: Preliminary data for 2003.» *Natinal Vital Statistics Reports*. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 2005. Vol 53, No. 15.
- Jenden, DJ. Nutrition and the Brain. Vol. 5. New York: Raven Press, 1979.
- Jensen, J Eric, Dick J Drost, Ravi S Menon, et Peter C Williamson. «In vivo brain 31P-MRS: measureing the phospholipid resonances at 4 tesla from small voxels.» *NMR Biomed 15*, 2002: 338-347.
- Kaiser, LG, N Schuff, N Cashdollar, et MW Weiner. «Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain.» *Beurobiol. Aging 26*, 2005: 665-672.
- Kaminogo, M, et al. «Diagnostic potential of short echo time MR spectroscopy of gliomas with single-voxel and point-resolved spatially localized proton spectroscopy of the brain.» *Neuroradiology* 43, 2001: 353-363.
- Kantarci, K, et al. «1H MR spectroscopy in common dementias.» Neurology 63, 2004: 1393-1398.
- Kantarci, K, et al. «Longitudinal 1H MRS changes in mild cognitive impairement and Alzheimer's disease.» *Neurobiol Aging 28*, 2006: 1330-1339.
- Kreis, R, J Slotboom, L Hofmann, et C Boesch. «Integrated data acquisition and processing to determine metabolite contents, relaxation times, and macromolecule baseline in single examinations of individual subjects.» Magn Reson Med 54, 2005: 761-768.
- Kreis, R, T Ernst, et BD Ross. «Development of the human brain: in vivo quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy.» *Magn Reson Med 30*, 1993: 424-437.
- Le Fur, Yann, François Nicoli, Maxime Guye, Sylviane Confort-Gouny, Patrick J Cozzone, et Frank Kober. «Grid-free interactive and automated data processing for MR chemical shift imaging data.» *MAGMA 23*, 2010: 23-30.
- Loessner, A, A Alavi, KU Lewandrowski, D Mozley, E Souder, et RE Gur. «Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: normal patterns and changes with age.» *Nucl Med 36*, 1995: 1141-1149.
- Luo, Y, Robin A. de Graaf, L DelaBarre, A Tannus, et M Garwood. «BISTRO: An outer-volume suppression method that tolerates RF field inhomogeneity.» *Magn Reson Med* 45, 2001: 1095-1102.
- Mans, Anke M, M Regina DeJoseph, et Richard A Hawkins. «Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure.» *J Neurochem* 63, 1994: 1829-1838.
- Marjanska, M, EU Emir, DK Deelchand, et M Terpstra. «Faster metabolite 1H transverse relaxation in the elder human brain.» *PLoS One 8*, 2013: e77572.
- Mattson, MP, et T Magnus. «Ageing and neuronal vulnerability.» Nature Rev Neurosci 7, 2006: 278-294.
- Mecheri, G, et al. «In vivo hippocampal (31)P NMR metabolites in Alzheimer's disease and ageing.» *Eur Psychiatry 12*, 1997: 140-148.
- Mlynàrik, Vladimir, et al. «Proton and phosphorus magnetic resonance spectroscopy of a mouse model of alzheimer's disease.» J Alzheimers Dis 31, 2012: S87-S99.

- Moreno-Torres, A, J Pujol, C Soriano-Mas, J Deus, A Iranzo, et J Santa-Maria. «Age-related metabolic changes in the upper brainstem tegmentum by MR spectroscopy.» *Neurobiol Aging 26*, 2005: 1051-1059.
- Mrak, RE, ST Griffin, et DI Graham. «Aging-associated changes in human brain.» J Neuropathol Exp Neurol 56, 1997: 1269-1275.
- Narayana, PA, JS Wolinsky, EF Jackson, et M McCarthy. «Proton MR spectroscopy of gadolinium-enhanced multiple sclerosis plaques.» J Magn Reson Imaging 2, 1992: 263-270.
- Ogg, Robert J, Peter B Kingsley, et June S Taylor. «WET, a T1- and B1-insensitive water-suppression method for in vivo localized 1H NMR spectroscopy.» J Magn Reson B (104), 1994: 1-10.
- O'Sullivan, M, DK Jones, PE Summers, RG Morris, SC Williams, et HS Markus. «Evidence for cortical "disconnection" as a mechanism of age-related cognitive decline.» *Neurology* 57, 2001: 632-638.
- Pfefferbaum, Adolf, Edith V Sillivan, Maj Hedehus, Kelvin O Lim, Elfar Adalsteinsson, et Michael Moseley. «Age-related decline in brain white matter anisotrophy measured with spatially corrected echo-planar diffusion tensor imaging.» *Mag Reson Med* 44, 2000: 259-268.
- Pfeuffer, J, I Tkac, et R Gruetter. «Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo.» *J Cereb Blood Flow Metab 20*, 2000: 736-746.
- Plaschke, Konstanze, et Siegried Hoyer. «Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus.» *Int J Devl Neuroscience* 11, 1993: 477-483.
- Provencher, SW. «Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra.» Magn Reson Med 30, 1993: 672-679.
- Radpath, TW. «Signal-to-noise ratio in MRI.» Br J Radiol 71, 1998: 704-707.
- Raz, Naftali, et al. «Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers.» *Cereb Cortex* 15(11), 2005: 1676-1689.
- Reyngoudt, Harmen, et al. «Age-related differences in metabolites in the posterior cingulate cortex and hippocampus of normal ageing brain: A 1H-MRS study.» *Eur J Radiol* 81, 2012: e223-e231.
- Richard, Saunders. «Static magnetic fields: animal studies.» Prog Biophys Mol Biol 87, 2005: 225-239.
- Sahin, E, et RA Depinho. «Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing.» *Nature 464*, 2010: 520-528.
- Saunders, DE, FA Howe, A van den Boogaart, JR Griffiths, et MM Brown. «Discrimination of metabolite from lipid and macromolecule resonances in cerebral infarction in humans using short echo proton spectroscopy.» J Magn Reson Imaging 7, 1997: 1116-1121.
- Schieble, Thomas M, Anita K Costa, Dominic F Heffel, et James R Trudell. «Comparative toxicity of halothane, isoflurane, hypoxia and phenobarbital induction in monolayer cultures of rat hepatocytes.» *Anesthesiology (68)*, 1988: 485-494.
- Smart, SC, et al. «Identication of ethanolamine in rat and gerbil brain tissue extracts by NMR spectroscopy.» *NMR Biomed* 7, 1994: 356-365.
- Terry, RD, R DeTeresa, et LA Hansen. «Neocrotical cell counts in normal human adult aging.» Ann Neurol 21, 1987: 530-539.
- Van Dyke, RA. «Hepatic centrilobular necrosis in rats after exposure to halothane, enflurane, or isoflurane.» Anesth Analg 61(10), 1982: 812-819.
- Vaughan, JT, et al. «7T vs. 4T: RF power, homogeneity, and signal-to-noise comparison in head images.» *Magn Reson Med* 46, 2001: 24-30.
- Wakana, S, H Jiang, LM Nagac-Poctscher, PC van Zijl, et S Mori. «Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy.» *Radiology 230*, 2004: 77-87.
- Wijnen, JP, TW Scheenen, DW Klomp, et A Heerschap. «31P magnetic resonance spectroscopic imaging with polarisation transfer of phosphomono- and diesters at 3 T in the human brain: relation with age and spatial differences.» *NMR Biomed* 23, 2010: 968-976.
- Yang, Qing X, et al. «Analysis of wave behavior in lossy dielectric samples at high field.» Magn Reson Med 47, 2002: 982-989.
- Zhu, Xiao-Hong, et al. «Quantitative imaging of energy expenditure in human brain.» NeuroImage 60, 2012: 2107-2117.
- Zhu, Xiao-Hong, Ming Lu, Byeong-Yeul Lee, Kamil Ugurbil, et Wei Chen. «In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences.» *PNAS 112*, 2015: 2876-2881.