



**HAL**  
open science

# Développements méthodologiques en spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion pour l'exploration du milieu intracellulaire dans le cerveau de rongeur

Clémence Ligneul

► **To cite this version:**

Clémence Ligneul. Développements méthodologiques en spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion pour l'exploration du milieu intracellulaire dans le cerveau de rongeur. Biophysique [physics.bioph]. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS244 . tel-01632236

**HAL Id: tel-01632236**

**<https://theses.hal.science/tel-01632236>**

Submitted on 9 Nov 2017

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

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

# Développements méthodologiques en spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion pour l'exploration du milieu intracellulaire dans le cerveau de rongeur

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à **MIRCent**, CEA, Fontenay-aux-Roses  
Etablissement : Université Paris-Sud

École doctorale n°575  
Physique et ingénierie : électrons, photons, sciences du vivant (EOBE)

Spécialité de doctorat : PHYSIQUE

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses le 22/09/2017 par

**Clémence LIGNEUL**

## Composition du Jury :

Itamar RONEN Professeur, Radiology Department, Université de Leiden	Rapporteur
Dominique SAPPEY-MARINIER Maître de Conférences – Praticien Hospitalier, CERMEP, Université Lyon 1	Rapporteur
Emmanuel BROUILLET Directeur de Recherches CNRS, MIRCent, CEA	Examineur
Marie POIRIER-QUINOT Maître de Conférences, IR4M, Université Paris XI	Examineur
Jean-Michel FRANCONI Professeur, CRMSB, Université Bordeaux 2	Président du jury
Julien VALETTE Chercheur, MIRCent, CEA	Directeur de thèse



## Remerciements

---

Avant tout, je tiens à remercier Philippe Hantraye de m'avoir accueillie à MIRCen où j'ai pu profiter de très bonnes installations, ainsi qu'Emmanuel Brouillet, d'une part de m'avoir reçue au Laboratoire des Maladies Neurodégénérative, et d'autre part d'avoir été membre du jury de ma thèse. Je tiens également à remercier Itamar Ronen et Dominique Sappey-Marinier d'avoir rapporté mon travail de thèse ainsi que Jean-Michel Franconi et Marie Poirier-Quinot pour leur participation à mon jury de thèse.

Je ne vous raconte pas la galère que c'est pour essayer de trouver les mots correspondant à l'univers que vous représentez. Dans ma tête tout est très clair et tout s'accompagne de sourires, d'interactions riches et de nostalgie (déjà). D'une façon ou d'une autre chacun d'entre vous a contribué à rendre ces années de thèse lumineuses, humainement et scientifiquement. On se construit par l'interaction à l'autre, et vos multiples unicités ont ajouté de nombreuses pierres à la Clémence d'il y a trois ans et demi. Je me sens excessivement chanceuse d'avoir passé ce temps à MIRCen avec vous. Je crois que peu de labos possèdent une telle harmonie. Venez à Lisbonne !! J'aurais voulu vous faire un dessin géant mais ça ne rentre pas dans le format classique d'un manuscrit (et puis mon talent figuratif est plus limité que ce que je voudrais). Sur le papier en Times New Roman, tout a l'air super fade. J'espère que je réussirai à vous transmettre au moins un petit bout de tout ça, mais je ne pourrai pas être à la hauteur de tout ce que vous m'avez apporté.

Premier roulement de tambour pour ... boum boum boum boum (avec les bruitages c'est moins fade ?) ... Julien, bien entendu. Merci d'avoir été le directeur de thèse que tu as été (le meilleur donc). Ta rigueur, ton exigence scientifique et ta créativité en recherche font de toi un guide pour mes premiers pas de chercheur-né. Je te remercie aussi de ta capacité à écouter et à te remettre en question, c'est ce qui te permet de t'adapter à plein de cerveaux humains très différents et à tous les gérer avec brio. Tu m'as permis de partir tous les ans à l'ISMRM (et aux workshops), sièges d'interactions scientifiques passionnantes et moments privilégiés de la team RMN ! Notons aussi l'appel au voyage que ces conférences ont suscité : Toronto (et Boston), Singapour (et la Thaïlande), Hawaï (et Hawaï). Merci également de m'avoir toujours laissé gérer mon temps comme je l'entendais (que ce soit pour les voyages ou la course à pied). Merci pour tes conseils de lecture (je pense transmettre davantage la recommandation de Black-Out et All Clear de Connie Willis, que d'In Vivo NMR Spectroscopy, de Robin de Graaf, mais chacune a son charme) qui ont suscité des conversations en général plus calmes que nos débats politiques. Julien président !

Merci au seigneur des bois, Julien Flament, de veiller sur l'IRM et sur nos bonnes pratiques. Merci pour ta pertinence et ton sens du détail. Tu as subi avec le sourire mes dérives autoritaires sur ton régime pré-étape du tour (j'admire la performance mentale de rouler pendant 8h !), mais promis, plus de remarque sur ta consommation de bières ou de frites. Merci pour ta présence au quotidien (sauf pour la soutenance, mais bon c'est ça d'être une star du CEST, je m'incline), pour ta bonne humeur et ta bienveillance et pour tes vannes (même si elles sont parfois succédées d'un regard noir de ma part, je ris intérieurement !).

Jérémy, tu m'as supportée 3 ans à tes côtés que ce soit au bureau 110, en congrès, en vacances, en week-ends ou en soirée, merci ! Je retiens particulièrement ton amour pour les leggings violets et les cheveux longs, ainsi que tes brillantes interprétations du lapin du métro. Plus sérieusement, merci pour ton calme face à toute sorte de situation, pour ta gentillesse, ton humour, et globalement ta personnalité en or,



irradiant comme le gluCEST illumine l'hippocampe. Certains parlent de toi comme d'une boule d'amour, je ne peux qu'être d'accord.

Marco, or « SuperMarco », king of modeling (and muscles), thank you for your brightness and your kindness. We form a great diffusion team with Julien and you, and I do hope it will continue with time ! I am writing in English but je ne devrais pas ! Grazie per le nostre discussioni (su tutti i soggetti) ei nostri buoni tempi (source : Google trad). Edwin, thank you very much for your amazing work on astrocytes and thank you for your warmth and your constant smile, it was a pleasure to work with you.

Mélissa, je te souhaite bonne chance pour te lancer dans cette nouvelle aventure, mais tu vois, tu tombes dans une équipe plutôt super chouette !!

Merci à toute la team 1 qui m'a tant appris. Plus qu'une somme de connaissances, vous m'avez appris à réfléchir en ayant conscience que nous manipulons des systèmes vivants, et donc très complexes. Merci à Gilles d'animer cette équipe avec le sourire, de nous pousser à présenter nos résultats (promis en vrai on est content de le faire) et d'entretenir le dynamisme de ces interactions. Merci aussi pour ta bienveillance et ton enthousiasme à travailler avec l'équipe RMN ! Merci Carole pour tes questions ou tes remarques, toujours pertinentes et toujours intéressantes, ce qui nous permet d'approfondir et d'affiner nos idées. Merci Maria pour ta gentillesse et félicitations pour le futur mini-humain que tu vas mettre au monde ! Merci à vous trois pour vos développements sur le CNTF, je dois dire que j'aime bien ce modèle ! Merci Géraldine pour ta bienveillance et pour ta contribution au laboratoire avec la culture primaire.

Beaucoup de rires, des montagnes russes et une amitié construite en deux ans et demi : merci Brice de m'avoir accueillie dans la team RMN. J'ai énormément appris à tes côtés. Nos danses dans le bureau 110, ton humeur électrique, nos discussions, nos cinés, nos courses, nos brunchs, nos cafés... Tout me manque. Même ta provoc permanente en vient à me manquer ! Tu représentes quelque chose de très gros (non, pas dans ce sens-là), de presque fraternel (j'imagine que tu dirais plutôt maternel) et même loin, tu es proche (il est où Briçou ?).

Charlotte, merci pour ta chaleur (tu m'en procures même au quotidien grâce aux chaussons-licorne) et ta présence, même loin tu me soutiens ! Merci d'ailleurs pour tous ces Toffifee (à ton image, avec un gros cœur tendre), source de bonheur non-négligeable. Merci Marie, pour ta gentillesse et pour l'énergie que tu déploies lorsqu'il s'agit de rendre heureux les gens que tu aimes ! Je vous remercie Noémie et toi pour votre capacité à reconsidérer une situation qui semblait figée. Noémie, je ne parlerai pas de gâteaux brûlés (oups), je retiens surtout ta capacité à sourire et à rire malgré la fatigue de fin de thèse agitée que tu as eue ! Last but not least sur la team des 4, merci beaucoup Yaël pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et ta bienveillance à l'égard de chacun ! Le kébianc qui sommeille en toi m'a frustrée plus d'une fois, notamment lorsque tu accélères surnoisement et sans prévenir dans les bois. Bordeaux, ta Versailles de province, est effectivement une très belle ville : merci pour cannelés dont tu nous as gratifiés de temps en temps !

Juliette, je ne mets que ton prénom pour qu'il apparaisse en CTRL+F « Juliette ». Je ne vois pas trop de quoi je pourrais te remercier. Tu m'as obligée à courir, tu m'as presque tuée à plusieurs reprises à cause de ton excellent humour (puisque nous avons le même, j'ai du mal à le dénigrer), tu m'as forcée à dormir presque à même le sol en Mongolie et à me ridiculiser sur un poney si petit que mes jambes touchaient presque par terre (mais Lancelot était vaillant quand même). Que de souffrances ! En réalité je ne sais pas

comment te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi et pour tous ces moments (toujours de la meilleure qualité !) que nous avons passés ensemble. Je me sens trop chanceuse de cette amitié que nous continuons à développer quel que soit l'endroit où nous sommes. Je pense que tu le sais mais bon j'aurais aimé pouvoir le dire mieux encore. Un gros merci à Jérémie aussi !

Puisqu'on est dans le thème des anciens, un grand merci à Chloé qui m'a aidée pendant tout mon stage de Master 2 et m'a accompagnée et rassurée dans mes premiers pas en spectroscopie de diffusion. Merci également à Lucile d'avoir illustré mes premières notions d'astrocytes et merci à Romain d'avoir coaché nos premières séances de fractionné !! Merci Nam pour ta sympathie et pour les macarons que tu nous as rapportés de nombreuses fois (oui j'ai un faible pour les gâteaux, on l'aura compris). Merci Ioanna pour ton esprit rock ! Susannah, thank you for your soft eccentricity and your warmth. Merci Pierrick pour ton humour et pour les 3xTg.

Kelly, ton amitié, ta gentillesse et ton soutien quotidien et naturel ont été un vrai luxe tout au long de la thèse et plus particulièrement pendant cette dernière année. Merci d'avoir toujours répondu à mes questions aussi improbables soient-elles (et quel que soit le moment !) et de m'avoir réexpliqué sans perdre patience cent fois la voie Jacques 2, ainsi que les possibilités pour la moduler. Merci de nous avoir fait découvrir le Jura, par les fromages que tu nous as rapportés mais aussi par la petite escale qu'on a pu y faire en allant au ski (feu épaule) ! Ta capacité à enflammer le dancefloor en cas de musique des années 90 (et de défoncer le parquet des bars éventuellement) est toujours une garantie de bonne soirée ! Merci Laurene pour ta bonne humeur et ton sourire quotidien. Ton humilité et ta modestie sont appréciables mais n'oublie quand même pas que tu es formidablement drôle, intelligente et brillante et que tu peux te faire confiance (je te vois déjà faire non de la tête, merci d'arrêter immédiatement). En tant que coach, je déplore tout de même que tu n'exploites pas davantage ton potentiel pour la course à pied (en plus j'avoue que j'aime bien te crier dessus car tu accélères à chaque fois beaucoup !). Ludmila, merci pour ta présence naturelle et chaleureuse aux déjeuners et merci pour le point de vue extérieur que tu apportes au laboratoire !

Séverine, ton énergie et ton aptitude à rebondir quelques soient les difficultés qui se présentent à toi surprennent tout le monde. Merci donc pour l'exemple de persévérance que tu es. J'ai confiance dans le fait que tu réussiras quelle que soit la voie que tu empruntes. Merci également pour ta pédagogie, ta spontanéité et ta franchise qui ont coloré un bon nombre de nos déjeuners ! Merci pour le regard que tu m'apportes pendant nos discussions (parfois existentielles). De Lantages à la Thaïlande, de la cave au R+2, de la cantine aux bars, j'ai déjà plein de souvenirs fluffy et lumineux (ceci est en effet une référence capillaire, j'ai également une fascination pour tes cheveux que je n'ose pas trop couper) avec toi et je sais que nous en aurons de nombreux autres. Audrey, merci pour ta gentillesse, tes réponses enthousiastes aux propositions de verres et ta propension extrêmement drôle au commérage (« moi ?! c'est pas vrai ! » Si, mais tu nous fais bien rire !). Fais également davantage confiance au double-docteur que tu vas être, il n'y a aucun hasard dans ta brillante réussite. Merci à notre petit soleil, Anastasie ! Tu as été adoptée au premier contact, mais tu ne nous as pas laissé le choix, merci d'être naturellement aussi chaleureuse, lumineuse et curieuse !

Camille, merci pour ton soutien infaillible, ta joie de vivre et ton énergie. En un an et demi (et beaucoup de cafés, de vacances, de course-brunch et de soirées), nous avons développé une amitié qui m'est très précieuse, j'ai l'impression de te connaître depuis bien plus longtemps. Merci pour ta franchise et ton pragmatisme, je sais toujours sur quel pied danser avec toi. Tu es pertinente dans tout ce que tu

entreprennis et j'admire sincèrement ta capacité à t'adapter quel que soit ton environnement et à toujours trouver ta place (ce qui est en plus très pratique car on peut t'emporter partout, en famille ou avec des amis). Pendant encore deux ans nous pourrons discuter d'égal à égal avec un titre de docteur, puis tu me surpasseras à nouveau ! Merci Lucie pour tes moments absurdes très drôles et pour tes accès de fous rires communicatifs, je te souhaite un superbe voyage de noces à venir !

Marianne, promis, même si tu es très sollicitée pour tes talents de cuisinière/pâtissière, ce n'est pas ce que je retiens chez toi (même si tes cookies sont incroyables et que tu nous as fait un Kouign Amann affreusement bon). Je retiens surtout toutes tes petites attentions pour chacun qui font chaud au cœur (par exemple, un Martini salvateur après un HNO du samedi !), j'adore discuter avec toi de tout car ton point de vue est toujours très enrichissant et c'est toujours plus sympa d'être au moins deux féministes dans une pièce ! Prof ou chercheuse, le milieu qui t'aura sera chanceux !

Dimitri, ou devrais-je dire Dieumitri, notre triathlète préféré, merci pour ta gentillesse et ton attention tout au long de ma thèse. Je t'ai découvert un peu plus tous les ans, sous toutes les coutures (Camille, Kelly et moi avons également apprécié le côté sans couture au ski). Au-delà du sportif, j'ai adoré apprendre à connaître le Dimitri curieux de tout, enthousiaste et taquin. Je ne désespère pas tout à fait de te faire faire une thèse un jour (sous ma direction bien sûr), en attendant je pourrai toujours éventuellement t'envoyer des DM de Matlab. Merci Agathe d'être si spontanément à l'aise avec nous, MIRCen t'a adoptée !

Mylène, merci pour ta présence et ta bienveillance, tes tartes aux mirabelles (que j'associe au fait que tu es ma première copine-maman) et ta motivation à aller courir (coureuse de l'extrême oblige !). Tu nous as fait miroiter le propriétaire du Mammouth et de l'Adada (à raison), bars qui ont été des QG pendant cette thèse ! Merci Léopold pour ton entrain et pour ta capacité nous faire rire et bravo d'avoir surpassé ton appréhension pour la course à pied !

Merci petite Clémence (mini-moi) pour nos petits moments relaxants au bureau 110 (en partie à base de coton). Merci également d'avoir toujours répondu à mes questions aléatoires en biologie (quitte à m'apporter des bouquins !). Ta curiosité et ton envie de comprendre les choses sont remarquables. Par contre, je t'invite à aimer Paint davantage. Merci Clément d'avoir accepté sans t'offusquer mes demandes de silence au bureau 110 pendant la rédaction et merci pour ces débats aux déjeuners. Merci Nad pour ta prévenance, pour ta motivation perpétuelle à venir prendre un verre et pour ta capacité à débattre posément lorsqu'il s'agit de politique et de questions sociétales (contrairement à moi peut-être). Merci Marc d'avoir supporté le bruit du bureau 110 !

Ulysse, ton présupposé courroux de princesse ténébreuse (dont tu revendiques l'origine d'après la source sûre [signification-prénoms.com](http://signification-prénoms.com)) est finalement assez doux. Merci d'abord pour toute l'énergie positive que tu m'as envoyée en cette fin de thèse et pour la gentillesse que tu es capable de déployer. Merci aussi pour l'ensemble de nos discussions, même lorsque nous sommes d'accord (ce qui arrive souvent, sauf lorsqu'il s'agit de ton amour pour les films glauques), l'interaction reste riche ! Un humour presque fin, presque en toute circonstance, a accompagné les soirées, dîners, course-brunch (d'ailleurs même si tu m'as battue de 30 secondes à l'Ekiden, j'estime que j'aurais pu te battre), week-ends et vacances passés ensemble !

Merci à Charlotte, Océane, Pierre-Antoine et Suzanne pour les sourires et les discussions que vous avez apportés pendant votre stage de Master 2 ! Bon courage pour les trois années à venir et félicitations pour

l'obtention de vos bourses de thèse ! Thank you Francesco and thank you Pauline for your presence during coffees (and running !). Good luck with French for both of you ! Merci Alix pour ta présence et bon courage pour la suite de la thèse.

Merci Fanny pour ta douceur et ta bienveillance (il faut que tu viennes faire du fractionné avec nous avant que je parte !), merci Charlène pour ton humour et ta présence chaleureuse ! Merci Sonia de ne pas hésiter à mettre ta vie en danger pour les vidéos de thèse et merci pour ta prévenance. Merci Martine d'avoir partagé mon expérience du Rocky Horror Picture Show et merci d'encadrer l'expérimentation animale comme tu le fais. Merci Nadja pour l'exemple athlétique que tu donnes et merci pour ta gentillesse. Merci à Alexis, Marie-Claude, Karine, Caroline, Elsa, Pauline et Aurélie pour les discussions et les sourires chaleureux à la cafet du R+2. Merci à Gwen de nous avoir organisé tous ces goûters mensuels ! Merci Noëlle pour ta spontanéité et ta chaleur, mes mains ont senti la banane tout l'hiver ! Merci à Fred pour l'organisation des labmeetings qui nous entraînent à présenter nos résultats. Merci Lauranne pour tous nos sympathiques déjeuners à la cantine ! Merci à Thierry et merci Nicolas d'avoir sauvé une ou deux fois mes frayeurs informatiques. Merci Clément pour ta façon originale de voir les choses et merci Zhen-Zhen pour ta douceur. Merci Anne-Sophie pour ton dynamisme !

Merci à Kristell, Laurent (remerciement spécial pour les samedis à l'IRM) et Pascal de veiller à notre sécurité à MIRCen ! Un très grand merci également à Marie-Christine et Marie-Laure, les petites mains très efficaces de MIRCen qui nous facilitent la vie tous les jours et ou lors de nos missions (merci de m'avoir laissé trauilloter de nombreux manuscrits !), et merci Cécile d'avoir géré les petites complications de remboursements ! Big up pour Didier, notre héros de l'informatique, qui nous sauve régulièrement de situations angoissantes !

Pour les copains de plus longue date, merci d'abord à ma version interchangeable, Marine. Merci pour ton attention, ta présence et ton énorme soutien à tous les moments de la thèse et d'être venue découvrir Hawaii avec moi ! Merci Audrey pour tous ces moments salés, tes petites attentions et tes conseils de lecture ! Merci Aurélia pour ta présence à ma soutenance ainsi que pour toute l'attention que tu m'as donnée en fin de thèse ! Merci à vous trois pour nos nombreux dîners du dimanche soir, nos vacances et nos week-ends passés ensemble !

Merci Nico pour notre amitié construite depuis le début de l'école et merci à tous les copains de cœur cœur love love pour ces moments que l'on partage depuis 7 ans ! Merci à Arnaud, Adrien et Clément d'avoir assisté à la soutenance et merci Thibault et Melch pour votre soutien ! Merci Louis, Eric et Matthieu pour votre sagesse.

Merci à mes coloc, Arthur et Paul (et Zlatan), d'avoir partagé ma vie pendant ces trois années. Merci pour l'ambiance de cette coloc, pour nos soirées et pour nos débats (parfois légèrement tendus). Carnec, en tant que coloc honoraire, merci pour tous ces moments passés au 27R et merci pour ta géniance. Merci Théo pour ta compréhension et ta prévenance pendant ma période de rédaction !

Encore un petit saut dans le temps, et nous voici aux origines des BFF. Merci à Céline, mon petit boudin et merci à Chloé Bolderi (hihi). Merci Marie, d'être ma sœur d'adoption depuis 18 (courtes) années ! Merci à Hana, ma jumelle officielle. Un merci infini à vous 4 pour votre soutien infailible depuis 10 ans, pour nos moments passés ensemble où l'on se sent toujours comme à la maison et pour votre tolérance

quant à nos vies variables ! Vous êtes mon repère. Merci Lucile pour ta folie mesurée et merci Romain et Sylvestre pour nos interactions qui continuent malgré les années !

En se rapprochant du berceau, merci Anne Laure pour tous nos dîners et discussions profondes (ou moins profondes) qui me font toujours avancer, tu es ma cousine d'amour (pour toujours !).

Et enfin un grand merci à mon grand frère Romain, que j'admire depuis ma naissance et dont je suis un peu les traces (en tout cas celles qui ne glissent pas) depuis toujours. La fin s'achève avec le tout début, je remercie infiniment mon père qui m'éveille depuis toute petite à la science (et à la physique plus particulièrement) et ma mère qui m'a appris à considérer mon environnement humain avec respect et qui a modelé la personne que je suis aujourd'hui. Merci à vous deux de m'avoir donné la chance de grandir dans des conditions aussi faciles !

## TABLE DES MATIERES

---

Remerciements	3
Table des matières	9
<b>Introduction générale</b>	<b>17</b>

### PARTIE 1 Le contexte physique et paramètres biologiques d'intérêt

<b>1. Le contexte biologique</b>	<b>21</b>
1.1. Les cellules du système nerveux central	21
1.2. Paramètres morphologiques d'intérêt en conditions pathologiques	23
1.2.1. Neurones	23
1.2.2. Astrocytes	25
1.3. La compartimentation des métabolites et leur rôle potentiel	25
<b>2. De la diffusion libre à la diffusion restreinte</b>	<b>30</b>
2.1. Mouvement brownien, diffusion libre	30
2.1.1. Cas général de particules qui diffusent	30
2.1.2. Le coefficient de diffusion libre D	31
2.2. Tortuosité, restriction et anisotropie	32
2.3. La diffusion des métabolites comme biomarqueur de la morphologie des cellules	34
<b>3. Aperçu des principes RMN pour l'acquisition d'un spectre</b>	<b>37</b>
3.1. Le signal RMN	37
3.1.1. Une parenthèse quantique s'ouvre	37
3.1.2. Et se referme classiquement	40
3.2. Le déplacement chimique, ou pourquoi il est possible de distinguer une molécule d'une autre	41
3.3. Les impulsions RF et la particularité des impulsions adiabatiques	42
3.3.1. Les impulsions classiques	43
3.3.2. Les impulsions adiabatiques	43
3.4. La localisation en spectroscopie	44
3.4.1. Détermination du voxel	46
3.4.2. Erreur liée au déplacement chimique en spectroscopie	50
3.4.3. Suppression de l'eau	49
<b>4. Acquérir un spectre pondéré en diffusion</b>	<b>50</b>
4.1. Mesure de la diffusion par RMN grâce aux gradients de diffusion	50
4.1.1. Approximation des gradients courts	51
4.1.2. Cas général	52
4.1.3. Cas de la diffusion encombrée	53

4.2. Le q-space	54
4.3. Le tenseur de diffusion	56
4.4. Les termes croisés	56

## PARTIE 2 La diffusion à toutes les échelles dans le cerveau de rongeur

<b>5. Méthodes communes des expériences RMN</b>	64
5.1. Hardware et expérimentation animale	64
5.1.1. 11.7 T	64
5.1.2. 7 T	65
5.2. Post-processing	66
5.2.1. Rephasage individuel	66
5.2.2. Les courants de Foucault	68
5.2.3. Suppression du résidu d'eau	68
5.2.4. LCModel	68
5.3. Importance des macromolécules et acquisition des spectres de MM	69
5.3.1. Nécessité d'évaluer les macromolécules	69
5.3.2. Acquisition d'un spectre de macromolécules	70
5.3.3. Limites	72
5.4. Les différents types de fantômes utilisés	73
5.4.1. L'eau	73
5.4.2. L'éthylène glycol	73
5.4.3. Le gel d'agarose	74
<b>6. La séquence STELASER et ses applications</b>	75
6.1. Nécessité d'une nouvelle séquence par rapport à la STEAM	75
6.2. La séquence STELASER	75
6.2.1. Absence de termes croisés	76
6.2.2. Optimisation de la suppression de l'eau	77
6.3. Les très hautes valeurs de pondération en diffusion	78
6.3.1. Une dépendance à la relaxation ?	79
6.3.2. Méthodes spécifiques	81
6.3.3. Données brutes	83
6.3.4. Données dans leur ensemble : ajustement bi-exponentiel et ADC	86
6.3.5. Discussion et conclusion	88
6.4. Une autre application de la STELASER : les temps de diffusion très longs	91
6.4.1. Pourquoi la STELASER ?	92
6.4.2. Méthodes spécifiques	93
6.4.3. ADC en fonction du temps de diffusion	94
6.4.4. Conclusion	96
6.5. Conclusion et publications associées	96

<b>7. Les gradients oscillants pour l'exploration des temps ultra-courts</b>	98
7.1. Le formalisme fréquentiel	99
7.2. Gradients oscillants optimisés implémentés dans une séquence LASER	101
7.2.1. Le cosinus apodisé étiré	101
7.2.2. Gain sur la pondération en diffusion	103
7.2.3. La séquence : LASER asymétrique pondérée en diffusion	104
7.3. Méthodes spécifiques	105
7.4. Les macromolécules : un contrôle interne	106
7.5. Les résultats	109
7.5.1. Les hautes valeurs de b pour les gradients oscillants	109
7.5.2. L'ADC en fonction de la fréquence	111
7.6. Discussion	112
7.7. Perspectives : aller à des temps de diffusion encore plus courts	113
7.7.1. Nouveau gradient	113
7.7.2. Méthodes	114
7.7.3. Résultats	116
7.8. Conclusion et publications associées	117
<b>8. Exploitation des mesures de diffusion par la modélisation</b>	119
8.1. Le modèle des cylindres infinis et le modèle des sphères	119
8.1.1. Le modèle des cylindres infinis, dit des « neurites »	119
8.1.2. Le modèle des sphères imperméables	120
8.2. Les métabolites diffusent principalement dans les fibres	121
8.3. Modélisation de l'atténuation du signal aux hautes valeurs de pondération en diffusion à $t_d=63.2$ ms	123
8.4. Modélisation de l'atténuation du signal aux très longs temps de diffusion	125
8.5. Modélisation à des temps de diffusion très courts	127
8.5.1. Cylindres infinis	127
8.5.2. Limite de Mitra	128
8.6. Discussion	131
8.6.1. S/V	132
8.6.2. $D_{intra}$	133
8.7. Conclusion et publications associées	134

### PARTIE 3 Spectroscopie de diffusion : biomarqueur de la morphologie cellulaire ?

<b>9. Variation massive de la morphologie astrocytaire : la spectroscopie de diffusion y est-elle sensible ?</b>	140
9.1. Un modèle d'activation astrocytaire, induit par transfert de gène CNTF	140
9.1.1. Le CNTF protège de la perte neuronale en conditions pathologiques	140
9.1.2. Le CNTF comme modèle d'activation astrocytaire	140



9.1.3. La $\beta$ -galactosidase comme contrôle, gène correspondant LacZ	142
9.2. Méthodes spécifiques et principe de l'expérience	143
9.2.1. Protocole expérimental général	143
9.2.2. Protocole expérimental des expériences de RMN	144
9.2.3. Observations physiologiques	145
9.3. Le profil spectroscopique	145
9.3.1. Le voxel	145
9.3.2. Les macromolécules	147
9.3.3. Voxels spécifiques de 8 $\mu$ l du striatum ou du thalamus	148
9.3.4. Grand voxel mixte de 56 $\mu$ l	149
9.4. Spectroscopie de diffusion	151
9.4.1. Mesures aux hautes valeurs de pondération en diffusion	151
9.4.2. Mesure de l'ADC aux longs temps de diffusion	153
9.5. Modélisation des données	153
9.6. Microscopie co-focale	156
9.7. Discussion	157
9.7.1. Concentrations des métabolites selon les régions	157
9.7.2. Couplage spectroscopie/spectroscopie de diffusion	158
9.7.3. Hautes pondérations en diffusion	159
9.7.4. DTI	162
9.7.5. Différences avec les données présentées en §6.4	163
9.7.6. Conclusion et publications associées	163
<b>10. Application à un modèle souris de la maladie de Huntington (R6/1)</b>	<b>165</b>
10.1. La maladie de Huntington	165
10.2. Le modèle R6/1	165
10.3. Méthodes spécifiques	166
10.3.1. Protocole expérimental général	166
10.3.2. Protocole expérimental des expériences RMN	167
10.3.3. Observations physiologiques	167
10.4. Profil spectroscopique	168
10.4.1. Voxel et striatum	168
10.4.2. Les macromolécules	169
10.4.3. Voxels de 8 $\mu$ l	170
10.4.4. Voxel de 56 $\mu$ l	171
10.5. Spectroscopie de diffusion	173
10.5.1. Mesures aux hautes valeurs de pondérations en diffusion	173
10.5.2. Mesures de l'ADC aux longs temps de diffusion	174
10.6. Discussion	176
10.6.1. Concentrations	176
10.6.2. Pas de signe d'activation astrocytaire mais un autre type d'activation gliale ?	176
10.6.3. Le cas de la créatine totale	177

10.6.4. Le cas du NAA	178
10.6.5. Glutamate/Glutamine	178
<b>Discussion et conclusion générale</b>	180
Bibliographie	183
Liste des publications	199

## Table des abréviations

---

ADC	Coefficient de diffusion apparent
ADP	Adénosine di-phosphate
AFP	Adiabatic Full Passage
AHP	Adiabatic Half Passage
Ala	Alanine
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
A $\beta$	amyloïde beta
b	Pondération en diffusion
<b>B<sub>0</sub></b>	Champ magnétique statique
<b>B<sub>1</sub></b>	Champ magnétique oscillant
BDH	$\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase
BHE	Barrière hématoencéphalique
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer
CK	Créatine kinase
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cr	Créatine
D <sup>eff</sup>	Coefficient de diffusion effectif
D <sub>intra</sub>	Coefficient de diffusion intracellulaire libre
dIR	Double inversion recovery
D <sub>libre</sub>	Coefficient de diffusion libre
DTI	Diffusion tensor imaging
FA	Fractional anisotropy
FDG	Fluorodeoxyglucose

FID	Décroissance libre de l'induction
FT	Transformée de Fourier
G	Intensité du gradient
g	forme du gradient
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
$G_{diff}$	Gradient de diffusion
GFAP	Protéine gliobibrillaire acide
GFP	Green fluorescent protein
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
GS	Glutamine synthétase
Ins	myo-Inositol
IRM	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
Lac	Lactate
LacZ	Gène codant pour la $\beta$ -galactosidase
LASER	Localisation by Adiabatic SElective Refocusing
LDH	Lactate déshydrogénase
<b>M</b>	Aimantation macroscopique
M	Facteur des macromolécules
MA	Maladie d'Alzheimer
MH	Maladie de Huntington
MM	Macromolécules
NAA	N-acetylaspartate
PBS	Phosphate buffered saline (solution tampon)
PCr	Phosphocréatine
PGSE	Pulse gradient spin echo

RF	Radiofréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT	Temps de montée des gradients
S	Signal RMN
S0	Signal RMN non pondéré en diffusion
SGP	Short Gradient Pulse
sIR	Simple inversion recovery
SNC	Système nerveux central
STEAM	STimulated Echo Acquisition Mode
SVD	Single Value Decomposition
T <sub>1</sub>	Temps de relaxation longitudinale
T <sub>2</sub>	Temps de relaxation transversale
Tau	Taurine
tCho	Composés cholinergiques
tCr	Créatine totale
t <sub>d</sub>	Temps de diffusion
TE	Temps d'écho
TI	Temps d'inversion
TM	Temps de mélange
TR	Temps de répétition
VAPOR	VARIABLE Pulse power and Optimized Relaxation delays
$\gamma$	Rapport gyromagnétique
$\delta$	Durée d'un gradient de diffusion
$\Delta$	Durée entre deux gradient de diffusion
$\omega_0$	Fréquence de Larmor
$\omega_{RF}$	Fréquence de l'impulsion radiofréquence

## INTRODUCTION GENERALE

---

L'incidence des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson est en constante augmentation avec le vieillissement de la population. De façon générale, les maladies touchant le cerveau sont lourdes de conséquences pour le patient. La compréhension fondamentale du fonctionnement et de la structure du cerveau ainsi que des dysfonctionnements associés aux maladies neurodégénératives est cruciale. Elle est d'une part nécessaire au développement de thérapies et elle peut d'autre part faire émerger des biomarqueurs quantitatifs pour évaluer la progression de ces maladies ou l'efficacité d'un traitement. A l'échelle des cellules du cerveau (neuronaux et gliales) des altérations structurelles et métaboliques majeures sont observées en conditions pathologiques. Malheureusement, les méthodes d'imagerie non-invasives classiques ne permettent pas d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre du micron, nécessaire pour évaluer la morphologie des cellules. L'analyse des tissus ne peut que se faire par prélèvement direct et invasif sur le patient (biopsie) ou en post-mortem pour confirmer le diagnostic. Développer des moyens d'accéder à la morphologie cellulaire de manière non-invasive est l'un des défis que la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) pondérée en diffusion est susceptible de relever.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (LMN, UMR 9199), une unité du Molecular Imaging Research Center (MIRCent) du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Fontenay-aux-Roses. MIRCent fonctionne avec un certain nombre de plateformes permettant d'étudier les mécanismes de la dégénérescence et de développer des stratégies thérapeutiques géniques, cellulaires et médicamenteuses pour les maladies neurodégénératives, en particulier la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. MIRCent est un centre de recherche préclinique, la plupart des études sont donc réalisées en travaillant avec des modèles animaux (souris, rats, microcèbes, macaques).

La plateforme IRM dispose de deux scanners IRM précliniques. Le scanner IRM 7 T Agilent (Palo Alto, CA, USA) est principalement dédié aux études sur primates. Nous l'avons utilisé dans le cadre d'une étude sur rat (chapitre 7), mais l'ensemble des autres résultats de ce manuscrit a été acquis sur le scanner IRM 11.7 T (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) dédié à l'étude des rongeurs. Il est pourvu d'une antenne cryogénique, dédiée à l'étude des souris.

L'équipe de spectroscopie RMN développe actuellement des méthodes d'imagerie et de spectroscopie pour l'étude de la structure et du métabolisme cérébral. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse a d'abord été de développer des méthodes de spectroscopie du proton pondérée en diffusion pour l'exploration non invasive de la structure intracellulaire du cerveau de souris en poursuivant les travaux de Charlotte

Marchadour (thèse soutenue en 2012) et de Chloé Najac (thèse soutenue en 2014) sur des souris saines (Partie 2, chapitres 5, 6, 7, 8). Ces développements méthodologiques ciblent un intervalle très large de temps de diffusion (0.2-2000 ms), associé à un intervalle de distances de diffusion large (0.4-20  $\mu\text{m}$ ) pour extraire, grâce à une modélisation adaptée (chapitre 8), des paramètres d'intérêt comme le diamètre et la longueur des axones et des dendrites ou des processus astrocytaires. Aux temps de diffusion très courts (chapitre 7), l'utilisation des gradients oscillants est nécessaire. Nous proposons une optimisation de la forme des gradients permettant de raccourcir le temps d'écho. Aux temps de diffusion très longs et aux hautes valeurs de pondération en diffusion (chapitre 6), nous proposons une nouvelle séquence de spectroscopie de diffusion qui ne contient pas de termes croisés et qui permet d'évaluer justement la pondération en diffusion et le temps de diffusion.

Une fois ces méthodes mises en place sur souris saine, nous avons souhaité vérifier leur sensibilité sur un modèle de souris où les astrocytes sont massivement hypertrophiés (chapitre 9) et appréhender dans quelle mesure la spectroscopie de diffusion est sensible à une pathologie et peut éventuellement contribuer à sa compréhension, en utilisant un modèle souris de la maladie de Huntington (chapitre 10).

L'ensemble des publications et communications associées à ces travaux est fourni à la fin du manuscrit.

# **PARTIE 1**

## **CONTEXTE PHYSIQUE**

**ET**

## **PARAMETRES BIOLOGIQUES D'INTERET**





# CHAPITRE 1

## Le contexte biologique

---

Dans ce chapitre, quelques éléments de morphologie et de métabolisme des neurones et des astrocytes sont présentés. L'ensemble est non-exhaustif et très simplifié, et a uniquement pour objectif de permettre au lecteur de mieux saisir les tenants et aboutissants des études développées *in vivo* dans ce manuscrit.

### 1.1 Les cellules du système nerveux central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) est composé de plusieurs types de cellules, regroupées en deux catégories : les neurones, cellules excitables et unités de base de la transmission de l'information, et les cellules gliales qui assurent un ensemble de fonctions complexes et indispensables au bon fonctionnement du SNC. Grâce à la barrière hématoencéphalique (BHE), qui empêche la plupart des éléments présents dans le sang d'entrer en contact avec les neurones, le cerveau est l'un des organes les mieux protégés de l'organisme.

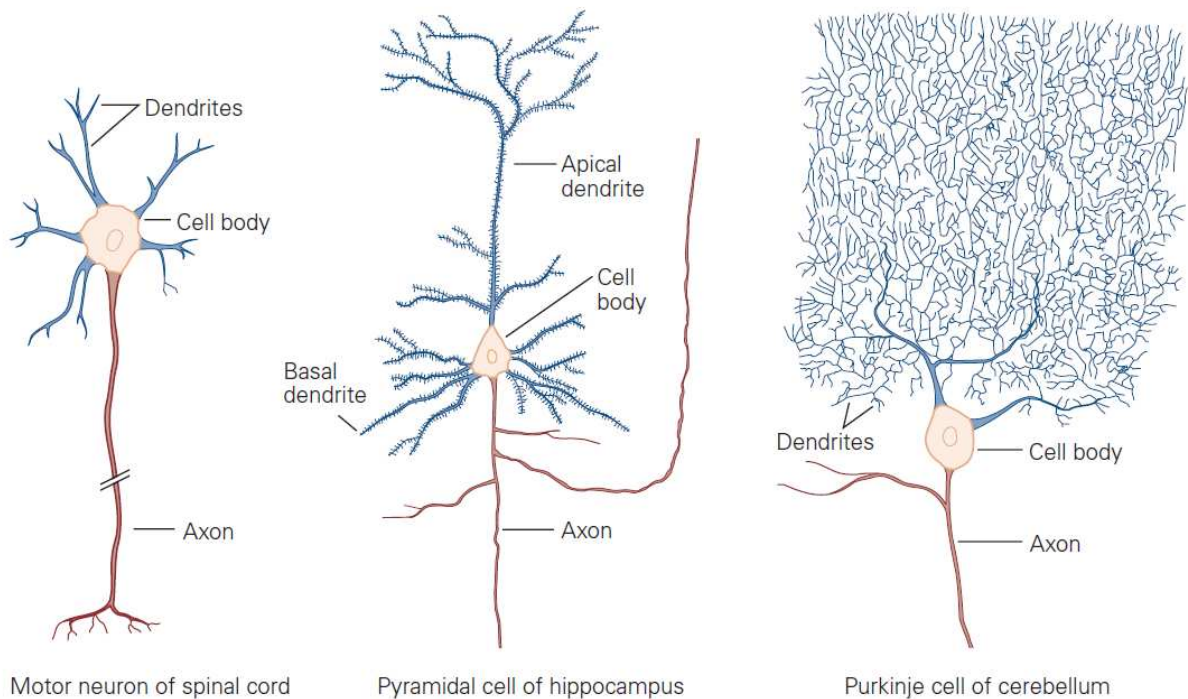
Les pathologies affectant le SNC sont donc très rarement d'ordre infectieux (méningites). Les maladies à prion, comme la maladie de Creutzfeldt-Jacob, entraînent une neurodégénérescence. De façon générale, les maladies affectant le plus couramment le SNC, comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont liées au vieillissement et sont neurodégénératives. Chez les populations plus jeunes, la maladie de Huntington est une affectation neurodégénérative purement génétique, rare et fatale. Le couplage intime entre neurones et cellules gliales entraîne une réponse gliale face à la neurodégénérescence.

#### *Les neurones*

Toutes les cellules possèdent un potentiel membranaire, lié à une différence de charge ionique entre l'environnement intracellulaire et extracellulaire. Les neurones se distinguent par leur capacité à générer un potentiel d'action grâce à l'organisation spatiale des canaux ioniques qui permet une modulation séquentielle du potentiel membranaire. L'information se propage donc dans la cellule sous forme de signal électrique puis elle arrive à la synapse, où le signal électrique est transformé en signal chimique pour passer d'un neurone à l'autre. Les messagers chimiques (neurotransmetteurs) sont libérés par le neurone présynaptique dans la fente synaptique et sont en partie recapturés par le neurone postsynaptique. Ces transferts causent à leur tour des échanges d'ions et une variation du potentiel de membrane du neurone postsynaptique et l'information s'y propage à nouveau sous forme de signal électrique. De façon extrêmement simplifiée, c'est ainsi que fonctionne la transmission de l'information dans le SNC.

Les neurones possèdent des morphologies très variées (Figure 1-1), mais quatre régions anatomiques les caractérisent :

- Le corps cellulaire, ou soma. Il contient le noyau et l'essentiel du cytoplasme. C'est le centre métabolique de la cellule. Le cytosquelette, composé de microtubules (tubuline), microfilaments (actine) et neurofilaments, part du soma et détermine la forme du neurone.
- Les dendrites sont caractérisées par la présence d'épines dendritiques qui reçoivent les contacts synaptiques des axones des neurones présynaptiques. Le diamètre des dendrites diminue depuis le corps cellulaire jusqu'à leur extrémité.
- Les axones sont des prolongements (parfois très longs) lisses et de diamètre plutôt régulier. Ils transmettent l'information électrique. L'axone part du corps cellulaire et se divise ensuite en collatérales plus ou moins nombreuses, très denses à la terminaison axonique.
- Les boutons synaptiques, aux terminaisons axoniques.



**Figure 1-1** : Différentes morphologies de neurones multipolaires du système nerveux central. Extrait de Principles of Neural Science, 5th Edition, Kandel et al.

### *Les astrocytes*

Les astrocytes sont les principales cellules gliales. Le rôle des astrocytes dans le SNC est extrêmement varié et pas encore totalement caractérisé. Une de leurs fonctions principales est le maintien du

fonctionnement synaptique. Ils recapturent le glutamate libéré dans la fente synaptique à l'aide de transporteurs au glutamate (GLT-1 et GLAST) et régulent ainsi l'excitotoxicité (Rothstein et al., 1996) à la synapse. Le cerveau représente environ 2% du poids d'un individu mais consomme 20% de l'oxygène et du glucose total. Face à ces besoins énergétiques, la réponse doit être optimisée et les astrocytes ont justement un rôle majeur dans le support métabolique aux neurones et la constitution d'une barrière fonctionnelle entre le sang et les neurones. Une des hypothèses de ce couplage métabolique est qu'en réponse à une absorption de glutamate dans les astrocytes, la glycolyse s'intensifie dans ces derniers et produit du lactate (Pellerin et Magistretti, 1994), puis que le lactate est envoyé dans les neurones (Pellerin et al., 1998). Après transformation en pyruvate, il est directement utilisable par les mitochondries des neurones pour répondre rapidement à leurs besoins énergétiques. Assurant donc le lien entre vaisseaux sanguins et neurones, les astrocytes sont également pleinement impliqués dans la régulation de la barrière hématoencéphalique. Ils participent aussi à la protection immunitaire et réagissent à l'inflammation. Ils se caractérisent au niveau protéique par la présence de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP).

Comme leur nom le suggère, les astrocytes ont une morphologie étoilée. Leurs corps cellulaires sont plutôt de petite taille et ils sont munis de nombreux prolongements ramifiés, dont certains se terminent par des parties élargies (les pieds astrocytaires).

*Les oligodendrocytes* forment une gaine de myéline autour de certains axones du SNC, notamment ceux de la matière blanche. La myéline isole les axones pour une meilleure conduction électrique. Elle est principalement constituée de lipides.

*La microglie* possède des propriétés de phagocytose et de mobilité, lorsqu'elle est sous sa forme activée. A l'âge adulte, cette forme peut apparaître dans des conditions pathologiques.

## **1.2 Paramètres morphologiques d'intérêt en conditions pathologiques**

Dans le contexte des maladies neurodégénératives, une infinité de marqueurs biologiques est susceptible de changer. La spectroscopie RMN et la spectroscopie RMN pondérée en diffusion permettant potentiellement d'être sensible à des changements d'ordre métabolique ou de morphologie cellulaire, nous décrivons rapidement dans ce paragraphe les principaux changements métaboliques et morphologiques accompagnant généralement ces pathologies.

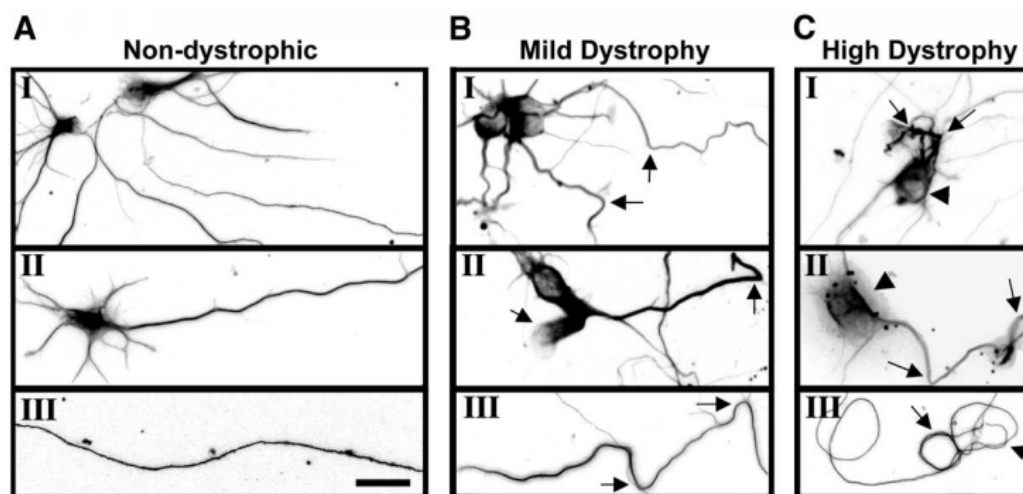
### **1.2.1 Neurones**

Dans les maladies d'Alzheimer (MA) et de Huntington (MH), une protéine, normale, soluble et fonctionnelle chez les sujets sains, présente un défaut et s'accumule dans l'espace intracellulaire (voire

intraneuronal) et finit par former des agrégats, délétères au bon fonctionnement du neurone. Dans la MA, il s'agit de la protéine Tau, anormalement phosphorylée, qui s'agrège jusqu'à former des dégénérescences neurofibrillaires, ainsi que la formation de plaques séniles extracellulaires amyloïde beta ( $A\beta$ ). Dans la MH, la huntingtine est anormale à cause de la répétition excessive (>40) du triplet CAG dans l'exon 1 du gène codant pour cette protéine. Anormalement conformée, la huntingtine mutée s'agrège également dans l'espace intracellulaire et cause une neurodégénérescence.

Avant la mort neuronale, ou en parallèle de celle-ci, les neurones peuvent subir des changements de morphologie :

- une dégénérescence axonale et dendritique, entraînant une atrophie neuronale. La figure 1-2 présente le type de dystrophie que peut entraîner la présence d' $A\beta$  sur des neurones en culture (Grace et al., 2002).
- une diminution du nombre d'épines dendritiques. L'étude de Spires et. al (2004) rapporte une diminution de la densité d'épines dendritiques dans un modèle de souris transgénique de la MH (R6/1) dans le striatum et le cortex.



**Figure 1-2:** Etude de la morphologie de la dystrophie neuronale induite par l' $A\beta$  fibrillaire sur des neurones en culture (extrait de Grace et al. 2002)

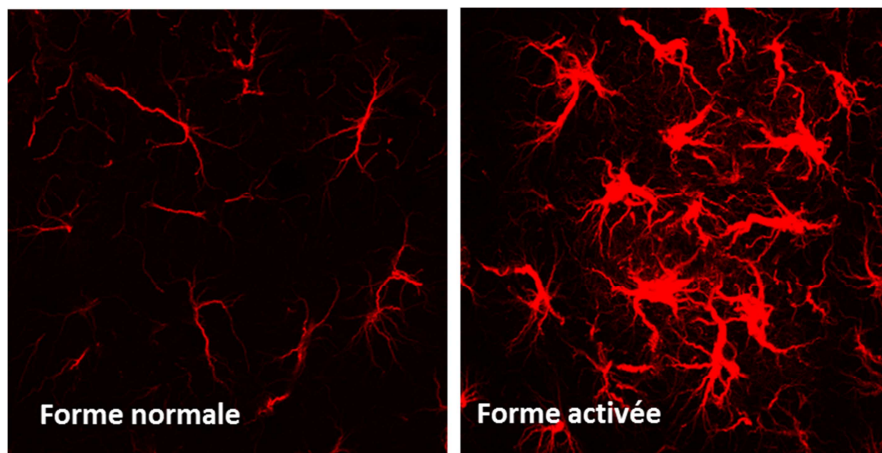
Ces phénomènes de dystrophie neuronale sont retrouvés dans d'autres maladies, comme la dépression (rétraction des épines dendritiques, Zhou et al., 2004) ou comme dans certains troubles psychiatriques. Dans le spectre des troubles autistiques, une augmentation de la densité dendritique peut être observée. Dans certains modèles de souris transgéniques avec troubles autistiques (Peça et al., 2011), une augmentation du volume du striatum est en plus rapportée. La morphologie des neurones est donc un

marqueur clé de l'état du cerveau et accéder à cette information de manière non-invasive pourrait permettre le suivi d'une pathologie. Le métabolisme neuronal peut également être affecté, entraînant généralement une baisse de la concentration des métabolites issus du métabolisme neuronal (§1.3).

### 1.2.2 Astrocytes

Suite à une lésion, ou dans la plupart des maladies neurodégénératives qui exhibent une mort neuronale, les astrocytes deviennent réactifs, parfois en amont des symptômes ou d'autres caractéristiques neuropathologiques (Benhaim et al., 2015). Cela se traduit par une augmentation de leur volume (Figure 1-3) et de leur complexité (quantifiable par une analyse de Sholl après un marquage histochimique sur la GFAP surexprimée par exemple), ainsi que par des changements fonctionnels (Sofroniew, 2015).

Les astrocytes sont de cibles thérapeutiques envisageables (Escartin et Bonvento, 2008 ; Hamby et Sofroniew, 2010) et être sensible au statut des astrocytes de façon non-invasive peut être un moyen de suivre l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement.



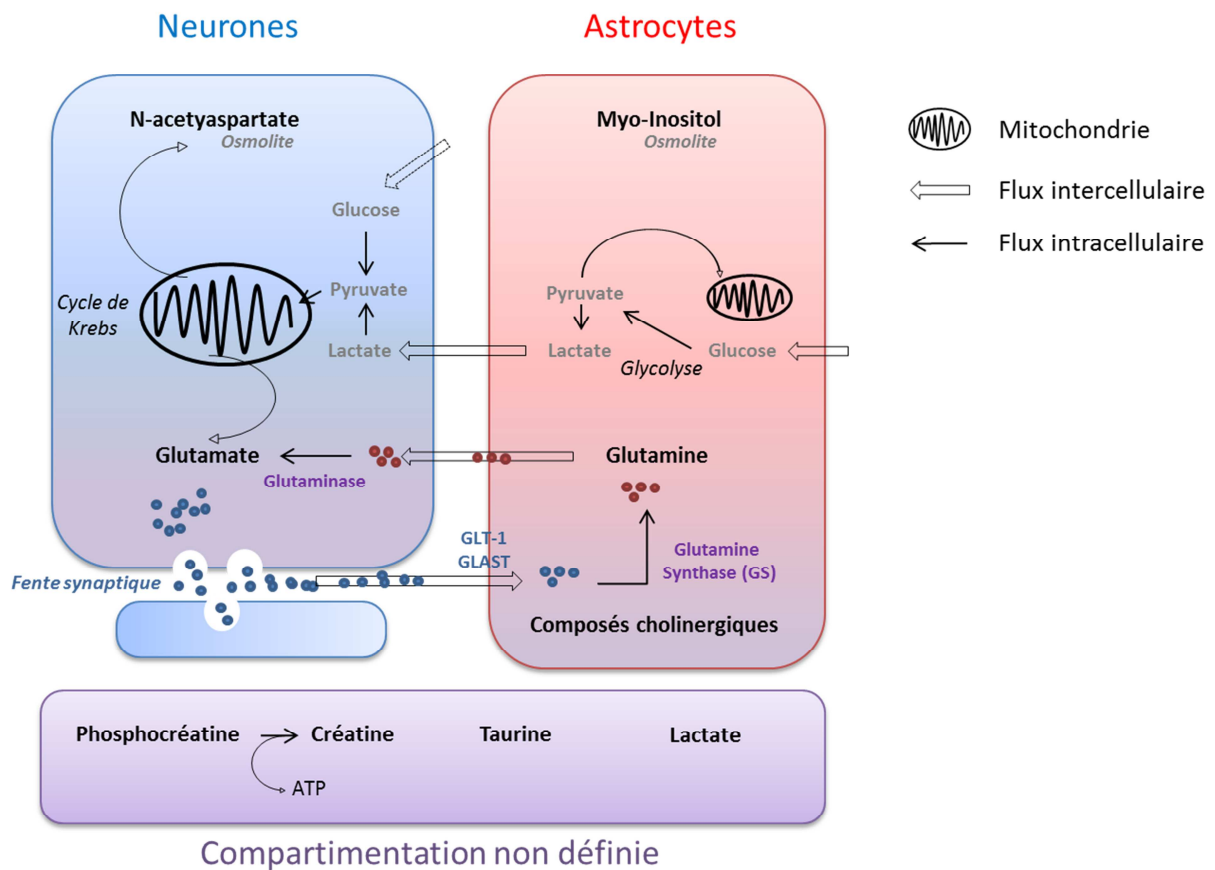
**Figure 1-3** : exemple d'astrocytes sous leur forme activée (droite) dans un modèle souris de la MA (APP/PS1 à 9 mois) par rapport à une souris contrôle (gauche). Marquage GFAP. © Kelly Ceyzériat (MIRCen)

### 1.3 La compartimentation des métabolites et leur rôle potentiel

En spectroscopie RMN (chapitre 3), seules les molécules suffisamment concentrées sont quantifiables *in vivo*. Dans ce paragraphe, les principaux métabolites (molécules issues du métabolisme) et osmolites détectables en spectroscopie RMN du proton sont présentés (Figure 1-4) ainsi que le type de cellule auxquels ils appartiennent préférentiellement, si pertinent. La revue de Choi et al. (2007) et l'étude de

Govindaraju et al. (2000) décrivent les métabolites détectables en RMN, du point de vue du métabolisme et de leur contribution au spectre. Etudier la compartimentation des métabolites n'est pas évident :

- Manque de marquages immunohistochimiques pour les différents métabolites. La fixation des tissus peut induire un biais sur la compartimentation.
- Les cultures cellulaires *in vitro* ne sont pas toujours représentatives de l'*in vivo*.
- Le tri cellulaire (FACS) est probablement la meilleure option mais il demande un nombre démesuré d'animaux pour pouvoir envisager de faire de la spectroscopie sur des échantillons de taille raisonnable d'astrocytes ou de neurones et le délai entre le sacrifice et l'analyse pourrait donner lieu à une compartimentation des métabolites altérée par rapport à l'*in vivo*.



**Figure 1-4** : représentation de la compartimentation des métabolites entre neurones et astrocytes et lien au métabolisme. Ce schéma très simplifié est adapté uniquement dans le cadre de ce manuscrit et n'est pas exhaustif.

Les métabolites sont presque exclusivement intracellulaires. Leurs concentrations basales extracellulaires sont à 1-50  $\mu\text{M}$ , excepté pour le lactate, plutôt à 200-400  $\mu\text{M}$  (Taylor et al., 1994 ; Hillered et al., 1989 ; Nilsson et al., 1990) et la glutamine, autour de 500  $\mu\text{M}$  (Tossmann et al., 1986 ; Cavus et al., 2005 ; Cruz et al., 2015). Leurs concentrations totales sont de l'ordre du mM (Govindaraju et al., 2000), d'où le caractère majoritairement intracellulaires de ces métabolites.

Nous répartissons principalement les métabolites entre neurones et astrocytes. Les astrocytes sont notamment plus nombreux que les cellules microgliales (2 à 3 fois plus dans l'hippocampe de souris par exemple, Long et al., 1998) et ont un volume cellulaire plus important. Il est raisonnable de considérer que la contribution de leurs métabolites est majoritaire. De plus, le temps de relaxation transversal des molécules présentes dans des régions très myélinisées (typiquement dans les gaines de myéline formées par les oligodendrocytes) est très court (Menon et Allen, 1991 ; de Graaf et al., 2006) et nous y sommes peu sensibles avec nos séquences de spectroscopie à temps d'écho relativement long.

- N-acétylaspartate (NAA)

La compartimentation du NAA est assez claire et quelques soient les sources et les modes d'étude, le NAA est toujours reporté comme un marqueur neuronal. En immunohistochimie, un marquage dense du NAA est observé dans les corps cellulaires neuronaux, les axones et les dendrites, et ce de façon plus intense dans les neurones aux arborescences denses ou aux longs prolongements axonaux (Simmons et al., 1991). La spectroscopie RMN sur des cultures cellulaires *in vitro* de glie et de neurones (Urenjak et al., 1992, 1993 ; Griffin et al. 2002) met également en évidence la présence presque exclusive du NAA dans les neurones. De plus, une baisse de la concentration de NAA dans le cerveau est souvent corrélée à une perte neuronale (très fréquent dans les maladies neurodégénératives). Toutefois, c'est parfois l'atrophie neuronale (diminution de la surface neuronale) et non la mort neuronale, qui est corrélée à une diminution de la concentration de NAA (Ferrante et al., 2000 ; Jenkins et al., 2000, 2005). Ces études tendent à confirmer l'appartenance neuronale du NAA et à en faire un curseur du bien-être neuronal. L'enzyme qui synthétise le NAA est localisée dans la mitochondrie. Sans être spécialement impliqué dans le métabolisme mitochondrial, un dysfonctionnement mitochondrial peut aussi entraîner une variation anormale du NAA (Matthews et al., 1993).

Le N-acétylaspartate pourrait être un osmolite neuronal (Taylor et al. 1995), cependant son rôle dans le SNC reste assez mal compris.

- Glutamate (Glu)



Le glutamate est plutôt concentré dans les neurones (Urenjak et al., 1993 ; Griffin et al., 2002). Il est le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau, mais la quasi-totalité de la concentration détectable en RMN provient du métabolisme et est intracellulaire.

- Glutamine (Gln)

La glutamine est un précurseur du glutamate et lui sert de réserve dans les astrocytes. La glutamine synthétase, l'enzyme qui produit de la glutamine à partir du glutamate est située exclusivement dans les astrocytes (Martinez-Hernandez et al., 1977). Il est généralement considéré étant un métabolite astrocytaire. Sa concentration extracellulaire est importante.

- Taurine (Tau)

La taurine joue un rôle dans l'osmorégulation (Solis et al., 1988 ; Taylor et al. 1995) et pourrait jouer un rôle dans la neurotransmission, notamment dans la régulation de l'excitotoxicité (El Idrissi et Trenkner, 2004) bien que ce ne soit pas clairement établi. Elle semble plus concentrée dans les astrocytes (Urenjak et al., 1993 ; Griffin et al., 2002) et elle est de façon générale très concentrée dans l'ensemble SNC.

- Créatine et phosphocréatine (tCr)

La créatine a longtemps été considérée comme un marqueur glial. Cependant, les études de spectroscopie *in vitro* (Urenjak et al. 1993 ; Griffin et al. 2002) montrent notamment que la créatine est globalement autant dans les neurones que dans les astrocytes. La phosphocréatine est un réservoir d'adénosine triphosphate. La concentration de créatine totale (créatine + phosphocréatine) est en général stable, sauf dans certaines conditions pathologiques.

- *myo*-Inositol (Ins)

Le *myo*-Inositol (Ins) est principalement concentré dans les astrocytes (Griffin et al., 2002). Le phénomène d'activation astrocytaire est en général corrélé à une augmentation de la concentration de *myo*-Inositol. La corrélation positive entre surexpression de la GFAP et augmentation de la concentration d'Ins est retrouvée dans des modèles pathologiques de rat épileptique, au foyer épileptique (Filibian et al. 2012) ; de souris APP/PS1, modèles de MA (Chen et al. 2012) ; de patients atteints de sclérose en plaque, aux sites de démyélinisation (Bitsch et al., 1999) et sur un modèle d'activation astrocytaire induite chez le rat (Carrillo-de Sauvage et al., 2015). Il a également été montré dans plusieurs études que *myo*-Inositol est un osmolite des astrocytes (Thurston et al., 1989 ; Strange et al., 1994 ; Isaacks et al., 1999). D'après une étude qui synthétise les résultats de nombreuses études rapportant les concentrations spécifiques de *myo*-Inositol des neurones (Fisher et al., 2002), la concentration de *myo*-Inositol ne dépasse pas les 4 mM

dans ces derniers, alors qu'elle est de 12-15 mM dans les astrocytes. Le myo-Inositol est donc au moins trois fois plus concentré dans les astrocytes que dans les neurones. L'ensemble de ces observations corroborent l'hypothèse d'une compartimentation astrocytaire du myo-Inositol.

- Composés cholinergiques (tCho)

Les composés cholinergiques sont composés de choline libre (Cho, très peu), de phosphocholine (PCho), et de glycérophosphocholine (GPC). La phosphatidylcholine, composant important des membranes cellulaires, est présente en quantité, mais est indétectable en RMN (son temps de relaxation transversal est très court et empêche son observation à des temps d'écho usuels – voir chapitre 3). Les composés cholinergiques détectables en RMN semblent être plus concentrés dans les astrocytes, mais dans des proportions modérées (Urenjak et al., 1993 ; Griffin et al., 2002). Cependant, l'étude de Le Belle et al. (2002) rapporte une concentration des composés cholinergiques de 1.5-2.2  $\mu\text{mol/g}$  dans tout le cerveau et par une autre méthode d'extraction, une concentration 27-41  $\mu\text{mol/g}$  dans les astrocytes. En normalisant par la créatine totale, cela donne  $[\text{tCho}]/[\text{tCr}]=0.15-0.25$  dans le cerveau total (proche de ce qui est mesuré *in vivo*), et  $[\text{tCho}]/[\text{tCr}]=1.9-2.4$  dans les astrocytes. Ceci représente une concentration des composés cholinergiques environ dix fois plus importante dans les astrocytes que dans les neurones.

- Lactate

Le lactate est le produit final de la glycolyse anaérobie. Des transporteurs du lactate le transfèrent des astrocytes (MCT1) aux neurones (MCT2) (Pellerin et al., 1998), et le lactate a donc été un certain temps considéré comme étant le « fuel » des neurones. Cette hypothèse ne prime plus dans la communauté scientifique. Le transfert du lactate des astrocytes aux neurones pourrait cependant avoir un rôle dans la potentialisation à long terme et la formation de la mémoire à long terme (Suzuki et al., 2011). Le lactate n'a pas de compartimentation spécifique et possède une composante extracellulaire importante.

- Les protéines

Les protéines, issues de la transcription et de la traduction du génome et assurant une multitude de fonctions, sont de grosses molécules, composées d'acides aminés. En spectroscopie RMN, la contribution au spectre de certains acides aminés de ces macromolécules est non négligeable (voir partie 2-I-c). Les protéines sont présentes dans toutes les cellules du cerveau.

## CHAPITRE 2

### De la diffusion libre à la diffusion restreinte

---

Dans ce chapitre, les principes de base de la diffusion sont présentés afin de comprendre dans quelle mesure l'étude de la diffusion des métabolites présentés dans le chapitre 1 permet potentiellement d'être sensible aux propriétés morphologiques des cellules auxquelles ils sont associés.

#### 2.1 Mouvement brownien, diffusion libre

Dans un milieu fluide (gaz, liquide) d'une température non nulle, les particules sont en mouvement perpétuel, stimulé par les chocs entre ces dernières : il s'agit de l'agitation thermique. On parle de diffusion brownienne ou de diffusion libre lorsque que la seule source de mouvement est cette agitation, portée par l'énergie cinétique interne et lorsque rien ne vient entraver ce mouvement (parois, obstacles) ou l'amplifier (flux).

##### 2.1.1 Cas général de particules qui diffusent

Le nombre de particules  $\delta^2 N$  traversant un élément de surface orienté  $d\mathbf{S}$  entre les instant  $t$  et  $t+dt$  peut s'exprimer avec un vecteur densité de flux de particules  $\mathbf{j}_N$  tel que :

$$\delta^2 N = \mathbf{j}_N \cdot d\mathbf{S} dt = d\Phi dt \quad (2-1)$$

$d\Phi$  est donc le flux élémentaire de particules. En considérant un volume élémentaire  $d\tau$ , on obtient :

$$\delta^2 N = -\text{div } \mathbf{j}_N d\tau dt \quad (2-2)$$

Un bilan local de particules entre les instants  $t$  et  $t+dt$  sur le volume élémentaire  $d\tau$ , avec  $n$ , définie comme la densité de particules diffusant, permet d'établir l'équation bilan suivante, qui traduit la conservation du nombre de particules :

$$\text{div } \mathbf{j}_N + \frac{\partial n}{\partial t} = 0 \quad (2-3)$$

La loi de Fick, définie empiriquement, relie  $\mathbf{j}_N$  à  $n$  via le coefficient de diffusion  $D$  qui dépend de la nature des particules qui diffusent et du milieu dans lequel elles diffusent.

$$\mathbf{j}_N = -D \text{grad } n \quad (2-4)$$

En combinant les deux équations précédentes, on dégage finalement l'équation de la diffusion

$$-D\Delta n + \frac{\partial n}{\partial t} = 0 \quad (2-5)$$

Intéressons-nous au problème posé dans le cadre de la diffusion libre isotropique.  $\mathbf{r}(t)$  est la position d'une particule à l'instant  $t$ . La densité de probabilité  $p$  d'une molécule initialement présente à la position  $\mathbf{r}_0$  se trouve à la position  $\mathbf{r}$  au temps  $t$  est solution de l'équation de la diffusion :

$$-D\Delta p(\mathbf{r}, t|\mathbf{r}_0) + \frac{\partial p(\mathbf{r}, t|\mathbf{r}_0)}{\partial t} = 0 \quad (2-6)$$

Conditions aux limites :  $p(\mathbf{r}_0, t = 0|\mathbf{r}_0) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)$  et  $p(\mathbf{r} = \pm\infty, t > 0) = 0$ .

Cette fonction est de la forme :

$$p(\mathbf{r}, t|\mathbf{r}_0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2}{4Dt}\right) \quad (2-7)$$

Elle décrit notamment le phénomène de diffusion brownienne. Il a été observé dès le XVII<sup>e</sup> siècle, mais caractérisé par Robert Brown en 1827 en observant une suspension de pollen dans l'eau. C'est Paul Lévy qui caractérise mathématiquement le mouvement brownien en 1933.

Le déplacement moyen  $\langle \mathbf{r} - \mathbf{r}_0 \rangle$  est nul car la diffusion brownienne est un processus aléatoire et isotrope. C'est le déplacement quadratique moyen  $\langle (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2 \rangle$  qui donne l'information sur l'espace exploré par une particule initialement en  $\mathbf{r}_0$ , établie par la relation d'Einstein-Smoluchowski :

$$\langle (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2 \rangle = \int (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2 * p(\mathbf{r}, t|\mathbf{r}_0) d\mathbf{r} \quad (2-8)$$

A une dimension, le raisonnement est le même et  $\langle (x - x_0)^2 \rangle = 2Dt$ . Il est donc possible d'extraire le coefficient de diffusion  $D$  à partir du déplacement quadratique moyen et du temps de diffusion.

Le coefficient de diffusion est donc une mesure de l'exploration de l'espace des particules pendant un temps  $t$  donné.

### 2.1.2 Le coefficient de diffusion libre $D$

Le coefficient de diffusion a été dans un premier temps défini empiriquement par la loi de Fick (1855). Les travaux sur la théorie cinétique des gaz au début du XX<sup>e</sup> siècle, inspirés des travaux sur le mouvement brownien, ont notamment permis de dégager l'importance de l'influence de la température et de la taille de la molécule sur le coefficient de diffusion libre.

La relation d'Einstein-Smoluchowski s'écrit :

$$D = \frac{k_B T}{K} \quad (2-9)$$

avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $K = \frac{F}{v}$ .

Couplée à la loi de Stokes, qui décrit la force de frottement d'un fluide s'écoulant sur une sphère en déplacement loin de tout obstacle ou paroi,

$$\mathbf{F} = -6\pi\eta R\mathbf{v} \quad (2-10)$$

avec  $\eta$  la viscosité dynamique,  $R$  le rayon de la sphère et  $\mathbf{v}$  la vitesse de la particule, on déduit la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (2-11)$$

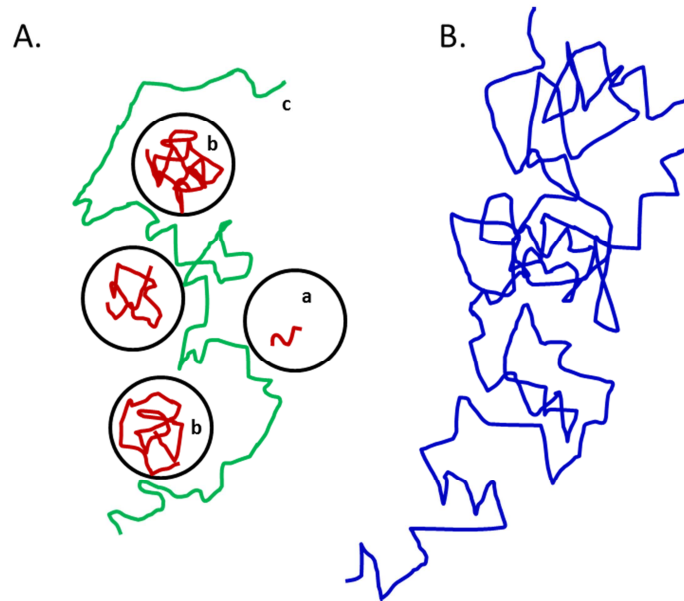
Les molécules d'intérêt ne sont généralement pas des sphères et cette expression du coefficient de diffusion doit être adaptée,  $R$  devenant une grandeur phénoménologique dépendant de la forme de la molécule mais aussi de son hydratation par exemple.

## 2.2 Tortuosité, restriction et anisotropie

Le milieu biologique est principalement liquide et est donc composé de molécules qui diffusent grâce à l'agitation thermique. Cependant, leur mouvement est entravé par les membranes des cellules, les protéines rencontrées, les organelles etc (Figure 2-1). Il est donc impossible de parler de diffusion libre dans le milieu biologique, sauf à aller vers des temps de diffusion extrêmement courts, pour n'être sensible qu'à la viscosité du cytosol ou du milieu extracellulaire, ce qui est un véritable défi expérimental.

Lorsqu'une molécule diffuse dans un espace confiné, on parle de diffusion restreinte. Au bout d'un certain temps de diffusion  $t_d$ , l'espace exploré est borné : le coefficient de diffusion tend vers 0. Lorsqu'une molécule est gênée dans ses déplacements par la présence d'obstacles, on parle de diffusion tortueuse. L'espace exploré croît continuellement avec l'augmentation du temps de diffusion, mais moins vite que s'il s'agissait de diffusion libre (Figure 2-2).

Le coefficient de diffusion de l'eau ou des métabolites mesuré *in vivo* ou dans des structures biologiques reflète cette tortuosité et cette restriction. La diffusion n'est plus caractérisée par l'immuable coefficient de diffusion libre : la diffusion apparente est caractérisée par un coefficient de diffusion efficace,  $D^{\text{eff}}$ , variable en fonction de l'environnement et du temps de diffusion.

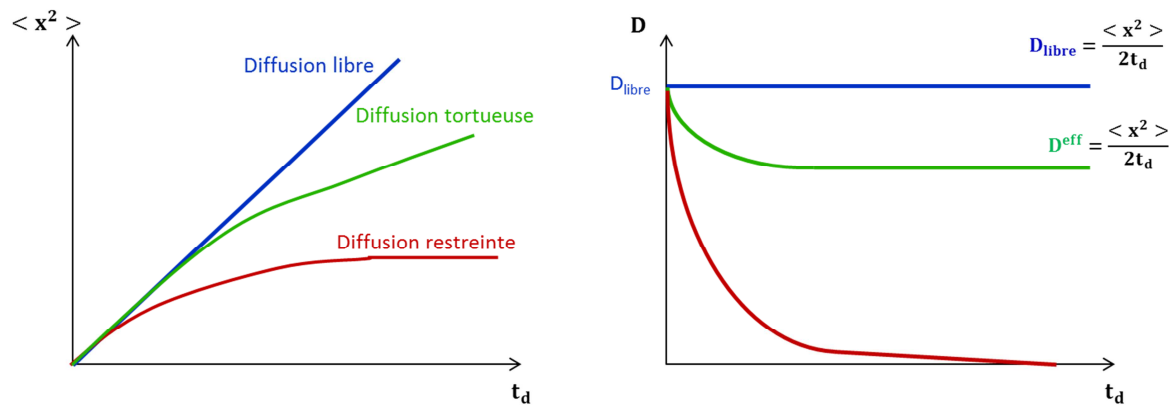


**Figure 2-1 :** (A) Exemple de la trajectoire d'une molécule dans un cas de diffusion tortueuse (c) ou restreinte, (a) pour un temps de diffusion très court, (b) pour un temps de diffusion long où la molécule ne peut plus explorer davantage l'espace. (B) Trajectoire pour une molécule diffusant librement.

La tortuosité peut en plus être source d'anisotropie. La matière blanche du corps calleux par exemple comporte un grand nombre d'axones orientés dans la même direction. Le gradient de particules ne diffuse plus de la même façon selon toutes les directions, la diffusion étant très restreinte dans le plan perpendiculaire aux fibres et plutôt libre dans l'axe parallèle à ces dernières. Pour tenir compte de cet effet, le tenseur de diffusion est introduit et l'équation 2-4 devient :

$$\begin{bmatrix} j_x \\ j_y \\ j_z \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} D_{xx}^{eff} & D_{xy}^{eff} & D_{xz}^{eff} \\ D_{yx}^{eff} & D_{yy}^{eff} & D_{yz}^{eff} \\ D_{zx}^{eff} & D_{zy}^{eff} & D_{zz}^{eff} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \frac{\partial n}{\partial x} \\ \frac{\partial n}{\partial y} \\ \frac{\partial n}{\partial z} \end{bmatrix} \quad (2-12)$$

La diffusion de particules est donc un moyen intrinsèque d'explorer un environnement géométrique dans lequel des particules sont confinées.



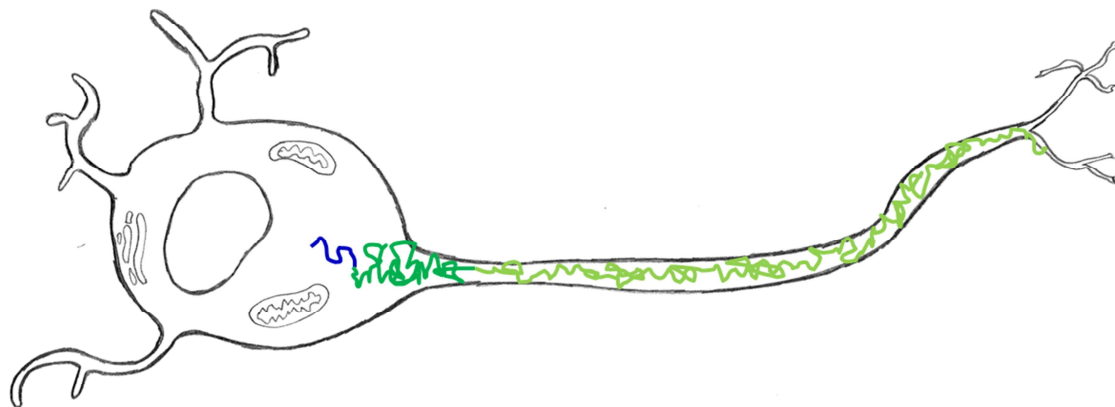
**Figure 2-2** : Déplacement quadratique moyen et coefficient de diffusion équivalent en fonction du temps de diffusion selon les différents types de diffusion.

### 2.3 La diffusion des métabolites comme biomarqueur de la morphologie des cellules

Une diversité immense de molécules diffuse dans notre organisme. Seule une petite variété est détectable en RMN. L'eau, qui a de loin le signal le plus fort, est ubiquitaire. Dans tout type de cellule et de milieu, les molécules d'eau diffusent. Ceci a permis à l'IRM de diffusion, avec le DTI (diffusion tensor imaging), de devenir le meilleur outil de diagnostic clinique pour les AVC (accident vasculaire cérébral) ischémiques (occlusion d'une artère cérébrale). Le signal à bruit de la mesure est donc très bon mais c'est au détriment de la spécificité. Pour extraire des composantes spécifiques (intracellulaire versus extracellulaire par exemple), il faut donc en général passer par des modèles qui dépendent d'hypothèses fortes (perméabilité des membranes, propriétés de diffusion dans le milieu extracellulaire etc).

Les métabolites sont par définition les produits du métabolisme cellulaire et appartiennent donc majoritairement au milieu intracellulaire. De plus certains appartiennent préférentiellement à certains types de cellules (§2.3). Certains des plus concentrés, à l'échelle millimolaire (environ  $10^4$  fois moins que l'eau), sont principalement compartimentés dans les neurones et les astrocytes (§1.3). Ces métabolites sont détectables en spectroscopie RMN (chapitre 3) et en font des cibles de prédilection pour explorer l'espace intracellulaire des neurones et des astrocytes, qui sont des types cellulaires dont la morphologie est sujette au changement dans de nombreuses pathologies cérébrales.

En étudiant la diffusion des métabolites à différents ordres de grandeurs de temps de diffusion et donc d'exploration spatiale, différentes propriétés cellulaires peuvent être appréhendées (Figure 2-3)



	Très courts	Intermédiaires (littérature)	Très longs
Temps de diffusion	0.1 – 10 ms	13 – 250 ms	500 – 10000 ms
Distance parcourue	0.3 – 2 $\mu\text{m}$	3 – 8 $\mu\text{m}$	9 – 50 $\mu\text{m}$
Caractéristique cellulaire visée	Viscosité du cytosol	Organelles Diamètre des fibres	Taille du soma Longueur des fibres

**Figure 2-3 :** Illustration de la restriction dans l'espace intracellulaire du SNC. Exemples de trajectoires d'un métabolite dans une cellule type neurone à temps de diffusion très court (bleu), intermédiaire (vert foncé) et très long (vert clair).

A temps de diffusion très court ( $<5$  ms), le métabolite n'a le temps de parcourir qu'un déplacement moyen très petit : il ne rencontre pas d'autres organelles ou membranes qui pourraient entraver sa diffusion. En tendant vers l'infiniment court, la mesure tend à se rapprocher du coefficient de diffusion intracellulaire libre et reflète la viscosité du cytosol.

A temps de diffusion intermédiaire (30-250 ms), le métabolite parcourt en moyenne quelques microns. Il a le temps de rebondir contre des membranes et d'être sensible à la tortuosité : c'est typiquement l'intervalle de temps de diffusion qui permet d'être sensible à la restriction liée au diamètre des fibres.

A temps de diffusion long ( $>500$  ms), le métabolite explore quelques dizaines de microns et est confronté aux caractéristiques à plus grande échelle de la cellule, comme la longueur des dendrites ou des axones dans les neurones, ou des processus astrocytaires.

Les métabolites ont des coefficients de diffusion *in vivo* beaucoup plus faibles que l'eau et explorent donc des distances beaucoup plus faibles, ce qui a notamment un avantage à temps de diffusion très courts où l'objectif est d'accéder aux déplacements les plus petits possibles.



Les coefficients de diffusion libre des métabolites auxquels nous nous intéressons dans ce manuscrit sont donnés dans la Table 2-1, mesurés à température ambiante et à température *in vivo*.

Table 2-1 : Coefficients de diffusion libre des différents métabolites et de l'eau.

<b>Métabolite</b>	<b>D (<math>\mu\text{m}^2/\text{ms}</math>) à 20°</b>	<b>D (<math>\mu\text{m}^2/\text{ms}</math>) à 37°</b>
<b>NAA</b>	0.70-0.75	0.83
<b>Glutamate</b>	0.78	
<b>Créatine totale</b>	0.77	1.00
<b>Taurine</b>	<i>A mesurer</i>	
<b>Choline totale</b>	0.93 (non totale)	
<b>myo-Inositol</b>	<i>A mesurer</i>	
<b>Eau</b>	2.05	2.95

## CHAPITRE 3

### Aperçu des principes de RMN pour l'acquisition d'un spectre

---

Ce chapitre donne un aperçu très bref des principes de physiques de résonance magnétique nucléaire (RMN) afin de permettre au lecteur non-avisé d'appréhender le lien entre RMN et acquisition de spectres. Pour une description plus exhaustive, nous conseillons la lecture d'ouvrages dédiés (Spin Dynamics : Basics of Nuclear Magnetic Resonance, de Malcolm H. Levitt ; In vivo NMR spectroscopy, Principles and Techniques, de Robin de Graaf).

#### 3.1 Le signal RMN

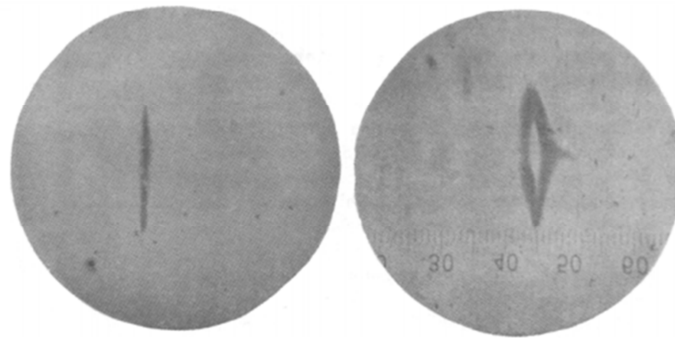
Le scanner IRM est composé d'aimants qui génèrent un champ magnétique statique  $\mathbf{B}_0$  au centre du scanner. Les atomes possédant un spin non nul sont sensibles à ce champ magnétique. L'abondance naturelle de l'hydrogène  $^1\text{H}$  (99.98%) et son rapport gyromagnétique élevé en ont fait le candidat de prédilection pour la majorité des techniques d'imagerie et de spectroscopie. Les études en RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{31}\text{P}$  sont assez courantes (puis d'autres noyaux sont plus rarement utilisés :  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  etc). Lorsque qu'une population de protons est soumise à un champ magnétique extérieur, il résulte à l'échelle macroscopique une aimantation de l'échantillon non nulle, alignée avec le champ magnétique statique  $\mathbf{B}_0$ . Le signal RMN provient de la précession des moments magnétiques des protons autour de  $\mathbf{B}_0$  à une fréquence  $\omega_0 = \gamma B_0$ ,  $\gamma$  correspondant au rapport gyromagnétique de l'atome.

##### 3.1.1 Une parenthèse quantique s'ouvre

*Le spin ?*

Plusieurs modèles se sont succédé au XXème siècle pour décrire l'atome le plus fidèlement possible. Le très simple modèle de Bohr (1913) s'appuie sur le postulat que les électrons se déplacent sur des orbites bien précises autour du noyau. Cela a permis d'illustrer la quantification de l'énergie de l'atome. En se désexcitant d'une couche supérieure à une couche inférieure, l'électron libère des photons d'une longueur d'onde bien précise (ex : spectre d'émission de raies de l'atome d'hydrogène). Le nombre quantique principal  $n$  décrit ces orbites. Le modèle s'est complexifié peu à peu, pour tenir compte du moment cinétique orbital des électrons (caractérisé par le nombre quantique orbital  $l$ ) et donc de leur moment magnétique orbital (caractérisé par le nombre quantique magnétique  $m$ ). Jusque-là, les analogies à la physique classique sont possibles.

En 1921, Stern et Gerlach font une expérience pour confirmer ou infirmer la quantification du moment cinétique, donc a fortiori du moment magnétique. Ils envoient des atomes d'argent dans un aimant à fort gradient de champ selon une direction Oz. S'il y avait bien une quantification du moment cinétique, ils s'attendaient à obtenir  $2l+1$  tâches. Sinon ils s'attendaient classiquement à une tâche de distribution continue le long de Oz. La surprise, qui a permis de découvrir une autre propriété des électrons et des particules élémentaires en général, est qu'ils n'obtinrent que deux tâches sur leur écran (Figure 3-1).



**Figure 3-1:** A gauche, image du faisceau sans champ. A droite, image du faisceau en présence du champ (gradient de champ appliqué horizontalement), le faisceau atomique est nettement séparé en deux composantes symétriques. Extrait de Gerlach et Stern, 1922.

Uhlenbeck et Goudsmit (1926) suggèrent que ce moment magnétique particulier mis en évidence par l'expérience, provient du moment cinétique de la rotation propre de l'électron, d'où le terme de « spin » qui est resté par la suite. Cette description, relativement classique, est fautive dans la mesure où l'électron ne tourne pas réellement sur lui-même. Nous sommes face à une propriété quantique plus abstraite, mais tout se passe « comme si » l'électron précéssait. Les atomes, mais aussi toutes les particules élémentaires possèdent un moment magnétique intrinsèque  $\mu$  (moment cinétique  $S$ ) que l'on appelle plus communément « spin », caractérisé par le nombre quantique de spin  $s$ . En spectroscopie RMN du proton et en imagerie RMN c'est le spin du proton auquel on est sensible. Il est difficile de sentir ce qu'est le spin car cette propriété n'a pas son équivalent à l'échelle macroscopique (contrairement à la masse propre ou à la charge par exemple).

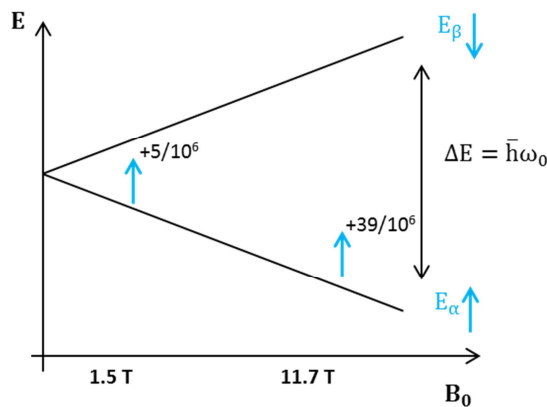
#### *Spin et RMN ?*

Le nombre quantique de spin  $s$  du proton vaut  $\frac{1}{2}$ . Le spin du proton existe sous deux états valant  $\frac{1}{2}$  (niveau d'énergie  $\alpha$ ) ou  $-\frac{1}{2}$  (niveau d'énergie  $\beta$ ). La fonction d'onde du spin, qui caractérise son état quantique est une combinaison linéaire de ces deux états. Par la mesure, on ne peut être sensible qu'aux états propres (l'exemple bien connu du chat de Schrödinger où l'ouverture de la boîte, la mesure donc,

caractérise l'état propre « mort » ou « vivant » du chat). Sur les figures, on peut considérer que l'on représente les états propres du spin « up » et « down ». En l'absence de champ magnétique, le spin d'un proton peut prendre toutes les directions possibles, correspondant au même niveau d'énergie. Lorsqu'il est soumis à un champ magnétique extérieur  $\mathbf{B}_0$  orienté selon Oz, l'énergie d'interaction entre son spin  $\mu$  et le champ s'écrit :

$$E = -\mu \cdot \mathbf{B}_0 = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar s B_0 \quad (3-1)$$

Il y a donc une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie  $E_\alpha$  ( $-\frac{\gamma \hbar B_0}{2}$ ) et  $E_\beta$  ( $\frac{\gamma \hbar B_0}{2}$ ) qui s'intensifie avec le champ  $B_0$ , c'est l'effet Zeeman.  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique de l'atome considéré.



**Figure 3-2 :** Illustration de l'effet Zeeman. L'application d'un champ magnétique statique à un spin provoque une levée de dégénérescence entre les états d'énergie  $\alpha$  et  $\beta$ . Sur un grand nombre de spins, cela crée une différence de population entre les niveaux  $\alpha$  et  $\beta$ , avec une surpopulation de spins sur le plus bas niveau d'énergie  $\alpha$ .

La fréquence  $\nu_0$  de la radiation électromagnétique qui permet de passer d'un niveau d'énergie à l'autre est telle que  $\Delta E = h\nu_0 = E_\beta - E_\alpha = \gamma \hbar B_0$ . D'où  $\omega_0 = 2\pi\nu_0 = \gamma B_0$ . Cette fréquence  $\omega_0$  s'appelle la fréquence de Larmor. Elle correspond à la fréquence de résonance des particules de spin  $1/2$  plongées dans un champ  $B_0$ . On peut la retrouver avec l'analogie classique.

Le niveau d'énergie  $E_\alpha$  correspondant au spin aligné avec le champ est en théorie le plus favorable. Cependant, la température des échantillons *in vivo* que l'on étudie se trouve en général autour de 310 K et cette agitation thermique provoque une répartition des spins presque égale sur les deux niveaux d'énergie. Sur une grande quantité de protons, la loi statistique de Maxwell-Boltzmann donne la répartition des spins dans chaque état d'énergie :

$$\frac{n_{alignés}}{n_{opposés}} = e^{\frac{\hbar\omega_0}{kT}} \quad (3-2)$$

A titre d'exemple, à 11.7 T, soit à une fréquence de Larmor de 500.3 MHz et à une température de 310 K (environ 37°C), on note un surplus de 39 spins alignés avec  $B_0$  ( $E_\alpha$ ) sur un échantillon de 1 million de protons à l'état d'équilibre (Figure 3-2). C'est en partie pourquoi il est quasiment impossible de mesurer directement l'aimantation résultante d'un échantillon de protons à l'équilibre, même plongé dans un champ  $B_0$  intense.

### 3.1.2 Et se referme classiquement

Lorsqu'on considère un échantillon constitué d'un grand nombre de protons, on peut manipuler les valeurs moyennes des moments cinétiques et magnétiques intrinsèques de ce dernier. Pour la suite de cette parenthèse, lorsqu'on parle de moment du proton par exemple, il ne faut pas voir ça comme le moment particulier d'un proton individuel, mais comme un moment moyen pris sur un grand nombre de protons. Pour la suite on s'en tiendra à la description classique, suffisante pour cette thèse et plus abordable.

La force de Laplace décrit la force exercée par un champ magnétique en présence d'une boucle de courant  $i$  (comme si le proton précessait et générerait un courant  $i$  avec un moment magnétique intrinsèque  $\mu$ ).

$$d\mathbf{F} = i d\mathbf{l} \times \mathbf{B} \quad (3-3)$$

La résultante des forces de Laplace sur une boucle est nulle. Le couple exercé par un champ magnétique  $B$  constant sur cette boucle de courant s'écrit  $\mathbf{C} = \mu \times \mathbf{B}$ .

Soit  $\mathbf{L}$  le moment cinétique du proton, lié au moment magnétique par  $\mu = \gamma\mathbf{L}$  et au couple par  $\frac{d\mathbf{L}}{dt} = \mathbf{C}$ .

On en déduit l'équation de mouvement du moment magnétique dans un champ extérieur  $\mathbf{B}$  :

$$\frac{d\mu}{dt} = \gamma\mu \times \mathbf{B} \quad (3-4)$$

Or,  $|d\mu| = \mu \sin(\theta)|d\phi| = \gamma|\mu \times \mathbf{B}|dt = \gamma \mu B \sin(\theta) dt$  d'où  $\omega = \left|\frac{d\phi}{dt}\right| = \gamma B$ .

Pour un champ magnétique constant  $B_0$  on retrouve donc la fréquence de Larmor  $\omega_0 = \gamma B_0$ .

L'aimantation de l'échantillon  $\mathbf{M}$  à l'échelle macroscopique résulte de la somme de tous ces moments magnétiques intrinsèques précessant parallèlement ou antiparallèlement à  $B_0$ .

$$(3-5)$$

$$\mathbf{M} = \sum_i \boldsymbol{\mu}_i$$

Il n'y a pas de cohérence de phase dans le plan transverse entre les  $\boldsymbol{\mu}_i$  donc l'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$  à l'équilibre thermique est un vecteur fixe. La précession des spins étant à l'origine du signal RMN, il faut imposer une cohérence de phase pour détecter l'aimantation.

### 3.2 Le déplacement chimique, ou pourquoi il est possible de distinguer une molécule d'une autre

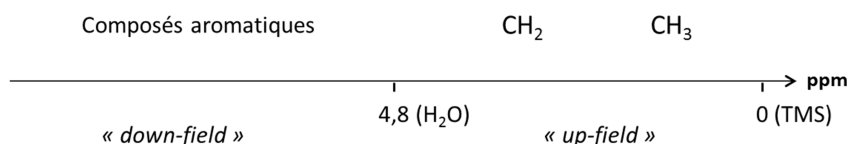
En réponse au champ  $\mathbf{B}_0$ , des courants sont induits dans l'environnement électronique du noyau. Cela induit un champ magnétique qui vient s'opposer au champ magnétique existant et le champ magnétique ressenti par un spin d'une molécule n'est pas  $\mathbf{B}_0$  mais  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$  tel que :

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0(1 - \sigma) \quad (3-6)$$

$\sigma$  est la constante d'écran. La fréquence de résonance de ces protons écrantés est  $\omega_{\text{eff}} = \gamma B_{\text{eff}}$ . Pour la RMN du proton, du carbone 13 et du silicium 29, la référence est en général le TMS (tétraméthylsilane), dont la constante d'écran est très forte pour le proton. Plus la constante d'écran est faible, plus on s'éloigne de la référence. Le déplacement chimique se définit en partie par million (ppm) comme :

$$\delta = \frac{10^6(\omega - \omega_{\text{ref}})}{\omega_{\text{ref}}} \quad (3-7)$$

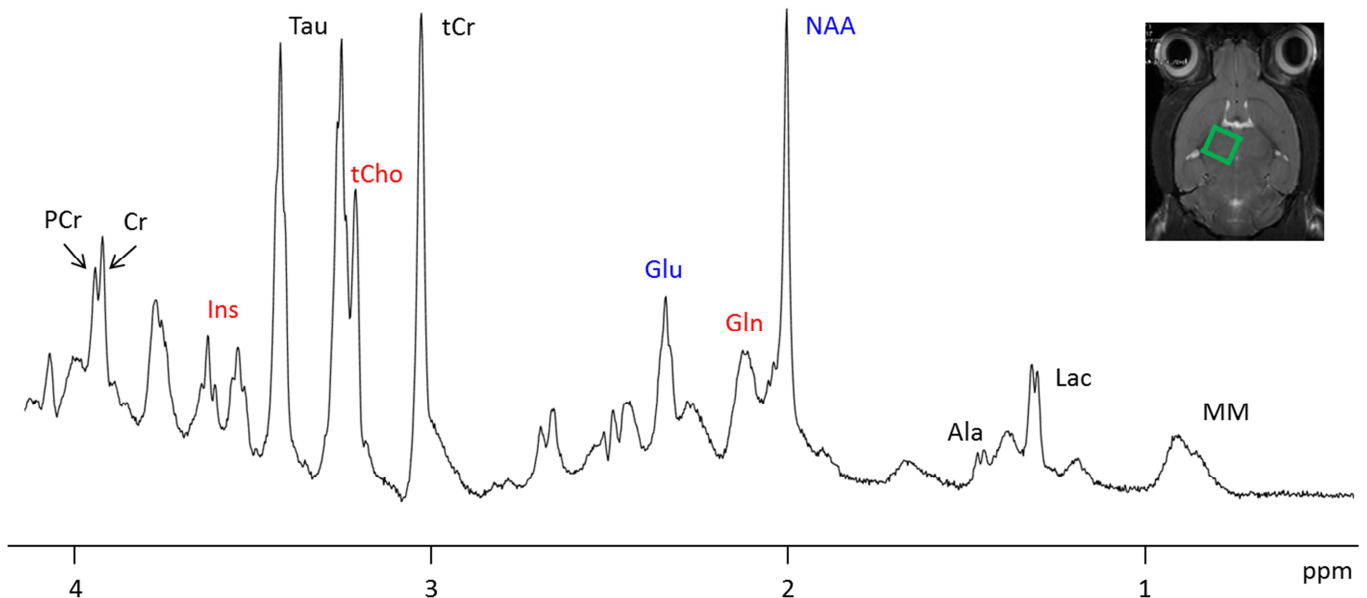
Plus le nuage électronique est autour du proton d'intérêt, plus sa résonance est proche du TMS, dont le déplacement chimique est arbitrairement fixé à 0. Très peu d'espèces sont plus blindées que le TMS. Un proton seul ( $\text{H}^+$ ) résonnerait à environ 40 ppm. Les protons de l'eau résonnent à 4.8 ppm. Ce champ induit permet de détecter des protons appartenant à des molécules et à des groupements spécifiques (Figure 3-3), qui ont une signature spectrale particulière grâce aux environnements électroniques des protons qu'elles possèdent.



**Figure 3-3** : Exemple de groupements détectables en spectroscopie RMN.

Plus il est possible de distinguer chaque résonance propre à un proton d'environnement électronique donné, mieux le spectre est résolu. Tout un pan de la RMN haute résolution (généralement multidimensionnelle) étudie notamment les spectres de molécules dont la structure est inconnue et résout des structures, étudie des interactions protéine-protéine etc.

Dans ce manuscrit, nous nous intéressons aux molécules concentrées et facilement détectables résonant à droite de l'eau (« up-field »). Par rapport à de la RMN haute résolution, les spectres acquis *in vivo* sont bien évidemment peu résolus, mais ils apportent déjà des informations considérables sur le contenu et le métabolisme des organes étudiés. La Figure 3-4 est un spectre obtenu dans le cadre d'une étude de la Partie 3, moyenné sur 6 souris, acquis dans un petit voxel à 11.7 T, ce qui permet d'avoir une très bonne résolution spectrale.



**Figure 3-4** : Spectre résultant de la somme de 6 spectres acquis sur 6 souris contrôle (chapitre 10) dans un voxel de 8  $\mu$ l placé autour du thalamus avec une séquence LASER (TE=20 ms). En bleu, les métabolites plutôt concentrés dans les neurones, en rouge, les métabolites plutôt concentrés dans les astrocytes. Encart : image pondérée en  $T_2$  et localisation du voxel.

### 3.3 Les impulsions RF et la particularité des impulsions adiabatiques

En appliquant un champ magnétique oscillant  $B_1$  à une fréquence proche de celle de Larmor, on induit une résonance entre les états d'énergies  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi qu'une cohérence de phase ce qui permet d'être sensible à la précession de l'aimantation macroscopique. Cette dernière bascule en présence du champ

$\mathbf{B}_1$ . En étudiant le retour à l'équilibre thermique des spins, ie les relaxations longitudinale (temps de relaxation  $T_1$ ) et transversale (temps de relaxation  $T_2$ ), on génère du contraste pour faire des images. Selon le tissu auquel un proton appartient, ses propriétés de relaxation diffèrent.

Aux prémices de la RMN, l'excitation des échantillons était réalisée avec une onde magnétique continue, balayant lentement les fréquences d'intérêt pour avoir directement accès au spectre. Cette technique est longue et le rapport signal à bruit résultant est relativement faible.

En 1965, Ernst et Anderson montrent l'intérêt des impulsions radiofréquences (RF) qui excitent d'emblée un intervalle de fréquences, avec des impulsions RF de très courte durée (~ms). Tous les spins d'une région spectrale donnée sont excités simultanément, la sensibilité et la quantité d'information sont accrues. Le signal récupéré est enregistré pendant la décroissance libre de l'induction qui suit l'excitation, ou « free induction decay » (FID). Soit l'acquisition peut être répétée plusieurs fois et le signal à bruit est significativement augmenté, soit le temps d'expérience peut être diminué pour un signal à bruit équivalent.

L'utilisation des impulsions RF devient donc le standard de la RMN moderne, ainsi que l'utilisation de la transformée de Fourier (FT) pour l'analyse du signal (Lowe et Norberg montrent en 1957 que la FID et le spectre sont la FT l'un de l'autre).

### 3.3.1 Les impulsions classiques

Pour une impulsion carrée et un champ  $\mathbf{B}_1$  à la résonance ( $\omega_{RF} = \omega_0$ ), l'angle de nutation de l'aimantation macroscopique est déterminé par :  $\theta = \gamma B_1 T$ , T correspondant à la durée de l'impulsion. Les impulsions classiques sont donc très sensibles aux inhomogénéités de champ  $\mathbf{B}_1$ . Dans nos protocoles, nous utilisons principalement une antenne de surface cryogénique. Les antennes de surface sont beaucoup plus sensibles et le  $\mathbf{B}_1$  transmis peut être très intense à proximité de l'antenne mais il est aussi un particulièrement inhomogène.

### 3.3.2 Les impulsions adiabatiques

Une solution pour parer la dépendance au  $\mathbf{B}_1$  est l'utilisation d'impulsions adiabatiques. Le principe consiste à effectuer un balayage de fréquences autour de la fréquence d'intérêt, avec un champ  $\mathbf{B}_1$  qui augmente progressivement et qui décroît ensuite. La figure 3-5 montre l'exemple d'un design d'impulsion hyperbolique sécante (HS), défini par :

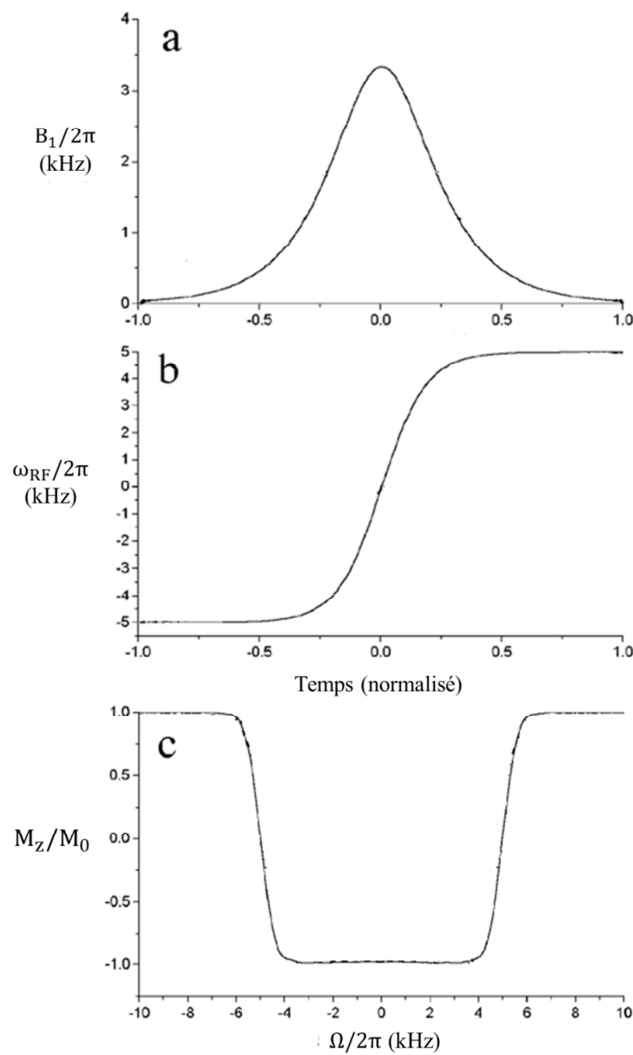
$$B_1(t) = B_{1\max} \operatorname{sech}(\beta t) e^{i\varphi(t)} \quad (3-8)$$



Avec  $\varphi(t) = \mu \ln(\text{sech}(\beta t))$ ,  $B_{1\text{max}}$  l'amplitude maximale de l'impulsion (en rad/s) et  $\beta$  et  $\mu$  sont des constantes réelles.

La fréquence de l'impulsion radiofréquence,  $\omega_{RF}$  n'est pas toujours à la fréquence de Larmor. La différence est  $\Delta\Omega = \omega_0 - \omega_{RF}$  et le champ effectif résultant n'est plus  $B_1$  mais  $B_{\text{eff}}$ .

$$B_{\text{eff}} = \sqrt{B_1^2 + \left(\frac{\Delta\Omega}{\gamma}\right)^2} \quad (3-9)$$



**Figure 3-5 :** Exemple de design d'une impulsion sécante hyperbolique modulé en amplitude (a) et en fréquence (b). Exemple du profil d'inversion obtenu (c) (adapté de Garwood et al., 2001). L'inversion est effectuée intégralement pour presque toute la bande passante.

L'aimantation précesse quasi-colinéairement autour de  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$  qui accompagne lentement la rotation de  $\mathbf{M}$ , définie par l'angle  $\alpha(t) = \arctan\left(\frac{\gamma B_1}{\omega_0 - \omega_{\text{RF}}(t)}\right)$ , soit l'angle entre  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$  et l'axe z (direction du champ  $\mathbf{B}_0$ ).

La condition d'adiabaticité, caractérisant l'indépendance à  $\mathbf{B}_1$ , est  $\frac{d\alpha}{dt} \ll \gamma B_{\text{eff}}$ . Cela traduit le fait que  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$  bascule suffisamment lentement pour que  $\mathbf{M}$  reste toujours presque aligné sur  $\mathbf{B}_{\text{eff}}$ . Le passage de  $\alpha$  de  $+90^\circ$  à  $-90^\circ$  est rapide autour de la résonance (correspondant à  $\mathbf{B}_{1\text{max}}$ ).

Plusieurs formes d'impulsions adiabatiques existent et toutes n'ont pas les mêmes propriétés. Dans ce manuscrit, les impulsions adiabatiques d'inversion et de refocalisation (AFP pour adiabatic full passage,  $180^\circ$ ) sont toujours des impulsions sécantes hyperboliques. L'inversion a lieu pendant la durée de l'impulsion, mais pas nécessairement à  $T_p/2$ , sauf pour  $\omega_0 = \omega_{\text{RF}}$ . Une impulsion AFP appliquée seule ne peut pas être utilisée pour la refocalisation car elle induit un déphasage non linéaire. Ce dernier peut être compensé par l'application d'une seconde impulsion AFP identique à la première. C'est pourquoi les impulsions adiabatiques AFP sont toujours utilisées par paires lorsqu'elles sont utilisées pour la refocalisation.

Pour l'excitation, il est également possible d'utiliser une impulsion adiabatique (AHP pour adiabatic half passage,  $90^\circ$ ). Le passage à  $90^\circ$  est effectif à la fin de l'impulsion, ce dont il faut tenir compte notamment pour l'implémentation des séquences et le calcul du temps d'écho.

### 3.4 La localisation en spectroscopie

En plus du champ statique  $\mathbf{B}_0$  et des impulsions radiofréquences  $\mathbf{B}_1$ , les gradients de  $\mathbf{B}_0$  permettent d'obtenir un signal marqué par la position du proton.

$$\mathbf{B}(\mathbf{r}) = \mathbf{B}_0 + \mathbf{G}\mathbf{r} \text{ soit } \omega(\mathbf{r}) = \omega_0 + \gamma\mathbf{G}\mathbf{r} \quad (3-10)$$

La fréquence de résonance dépend donc de la position. C'est cette propriété essentielle qui permet d'acquérir une image, ou de localiser un volume.

Dans le cerveau, l'eau est environ  $10^4$  à  $10^5$  fois plus abondante que les métabolites. Pour obtenir un signal suffisamment important et surtout quantifiable de ces derniers, l'acquisition d'un spectre se fait en général dans un voxel unique de taille non négligeable par rapport au cerveau. Le signal obtenu est un signal moyen sur l'ensemble du volume.

La capacité à déterminer un voxel d'intérêt, à localiser correctement, est primordiale :

- Les lipides, notamment présents dans la peau et les muscles ont un signal très fort, d'une part à cause de leur abondance et d'autre part à cause de leurs longues chaînes carbonées pleines de protons. Sans localisation, leur contribution sur les spectres proton devient majoritaire et déforme complètement le spectre. Il est possible de ne pas localiser le signal pour les noyaux X ( $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$ ).
- Bien que la spectroscopie RMN ne soit pas très sensible, elle est assez spécifique. C'est donc d'autant plus intéressant d'extraire des spectres de régions particulières, aux propriétés différentes et donc de récupérer le signal d'une région déterminée. Nous avons par exemple étudié les propriétés de diffusion dans un voxel localisé autour de l'hippocampe pour des souris modèles de la maladie d'Alzheimer ou autour du striatum pour des souris modèles de la maladie de Huntington (partie 3).

### 3.4.1 Détermination du voxel

L'objectif des séquences de localisation est que seuls les spins du volume que l'on a déterminé au préalable contribuent au signal de la FID acquise. Ces séquences basées sur l'utilisation des gradients de  $\mathbf{B}_0$  sont nombreuses, plus ou moins efficaces et se classent en deux catégories : les OVS (pour « Outer Volume Suppression ») et les séquences dites de Single Voxel Localization.

- La localisation en voxel unique (Single Voxel Localisation)

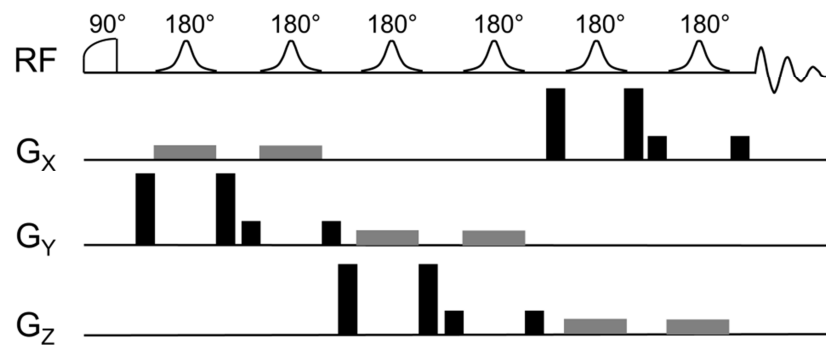
Le principe consiste à exciter sélectivement des tranches le long desquelles un gradient est appliqué. Pour localiser un parallépipède par exemple, il faut exciter trois tranches successivement, en appliquant des gradients selon ces directions et en excitant sélectivement un intervalle de fréquence qui détermine l'épaisseur de la tranche.

Les séquences de localisation en voxel unique les plus classiques sont la séquence ISIS (Image Selected In vivo Spectroscopy, Ordidge et al., 1986), la STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode, Frahm et al., 1989) et la PRESS (Point RESolved Spectroscopy, Bottomley, 1984). Elles sont généralement couplées à des OVS pour améliorer leur efficacité. Ces séquences ne sont pas décrites dans le manuscrit car nous ne les avons pas utilisées, mais elles sont très bien décrites dans la littérature. Les performances de ces séquences sont notamment comparées dans l'étude Yongbi et al. (1995). La revue de Duarte et al. (2012) fait le bilan des séquences de localisation existantes pour la spectroscopie proton localisée dans le cerveau.

Les principales sources d'artefacts sont liées aux sources de cohérences non souhaitées et mal déphasées, causées généralement par les différentes successions d'impulsions RF. Par exemple dans le cas de la STEAM, il est indispensable d'appliquer un gradient pendant le temps de mélange pour éviter les 4 échos de spins formés par les 4 combinaisons possibles entre les 3 impulsions RF à 90° de la séquence.

Dans ce manuscrit la localisation est réalisée avec une séquence LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing).

La séquence est proposée par Garwood et de la Barre (2001). Les impulsions AFP hyperboliques sécantes inversent l'aimantation de façon très homogène sur l'ensemble d'un intervalle de fréquences donné. Appliquées avec un gradient de  $\mathbf{B}_0$ , elles sont particulièrement adaptées pour sélectionner proprement une tranche d'aimantation.



**Figure 3-6** : Séquence LASER proposée Garwood et de la Barre en 2001.

Dans le cas de la séquence LASER (Figure 3-6), la sélection du voxel se fait par trois paires d'AFP, chaque paire définissant une tranche perpendiculaire aux deux autres. L'utilisation de paires d'AFP est nécessaire pour assurer la refocalisation (cf impulsions adiabatiques). Seuls les spins du volume d'intérêt sont refocalisés à chaque paire l'impulsions. L'aimantation en dehors du volume d'intérêt est déphasée grâce aux crushers placés autour des impulsions AFP.

Les bords du volume ainsi défini sont bien définis et le signal à bruit à l'intérieur du voxel est maximisé. Le train d'impulsions à 180° offre les mêmes avantages qu'une séquence de Carr-Purcell : les cohérences antiphase (liée au couplage scalaire) et la réduction apparente du  $T_2$  liée à la diffusion et aux échanges chimiques sont réduites.

Le profil de localisation est donc très bon et le spectre issu de cette séquence est d'excellente qualité. Le principal inconvénient de la séquence LASER est la difficulté de l'utiliser sur des scanners IRM cliniques

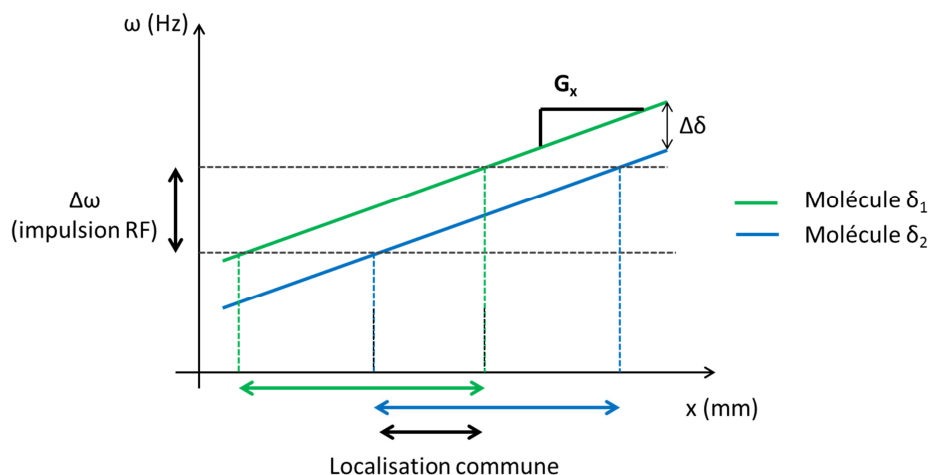
à haut champ ( $B_0 \geq 7$  T), car la puissance déposée est trop importante. Une séquence semi-LASER (Boer et al., 2011 ; Oz et Tkac, 2011) peut alors être utilisée.

- Les OVS (Outer Volume Suppression ou suppression du volume extérieur)

Le principe de cette technique bien nommée consiste à se débarrasser des spins hors du voxel pendant un temps de préparation en amont de l'excitation, qui n'excite alors que les spins d'intérêt. Pendant le temps de préparation, les spins hors du volume d'intérêt sont déphasés grâce à la combinaison de gradients de  $B_0$  et d'impulsions RF et cela est répété plusieurs fois pour assurer une bonne suppression du volume extérieur. Un des inconvénients de cette présaturation est que le profil fréquentiel des impulsions radiofréquences classiques (sinc), et donc le profil de la tranche sélectionnée dépend de l'amplitude de ces impulsions. Les impulsions adiabatiques sont utilisées pour avoir un profil fréquentiel propre et indépendant de  $B_1$ . Un exemple est la séquence BISTRO ( $B_1$  InSensitive Train to Obliterate signal) qui supprime la contribution des spins de tranches (éventuellement) obliques avant l'excitation. La séquence LASER localise très efficacement, nous n'utilisons donc pas les OVS dans les études présentées dans ce manuscrit.

### 3.4.2 Erreur liée au déplacement chimique en spectroscopie

Préalablement à la localisation, l'excitation à  $90^\circ$  concerne généralement un intervalle large de fréquences, centré sur les métabolites, afin d'exciter l'ensemble des molécules d'intérêt, de déplacements chimiques différents. La différence de déplacements chimiques  $\Delta\delta$  entre deux composés contribuant au spectre induit une différence sur le volume sélectionné suite à l'application du gradient de localisation (exemple sur la Figure 3-7 pour un gradient de localisation appliqué selon x qui sélectionne un intervalle de fréquences  $\Delta\omega$  pour deux molécules séparées de  $\Delta\delta$  sur le spectre). L'erreur  $\Delta x$  de localisation sur une coupe d'épaisseur  $L_{\text{coupe}}$  est  $\frac{\Delta x}{L_{\text{coupe}}} = \frac{\Delta\delta}{\Delta\omega}$ . Une solution pour diminuer cette erreur relative consiste à augmenter l'intensité du gradient. Il faut alors augmenter la bande passante des impulsions RF de localisation et donc  $B_1$  doit être augmenté. Sur les antennes classiques, le  $B_{1\text{max}}$  accessible est souvent trop faible. L'ajout d'un gradient variable pendant l'impulsion permet de ne pas avoir à augmenter le  $B_{1\text{max}}$  (Ordidge et al., 1996) et donc de minimiser l'erreur liée au déplacement chimique, qui peut être rendue négligeable sur le volume sélectionné pour les métabolites en général observés entre 2 et 4 ppm du spectre proton. Cependant, dans la mesure où nous ne sommes pas spécialement limités sur le  $B_{1\text{max}}$  avec l'antenne cryogénique, nous pouvons efficacement limiter l'erreur sur le déplacement chimique en augmentant la bande passante juste par augmentation du  $B_1$ . Par exemple, pour une bande passante de 10kHz, l'erreur liée au déplacement chimique est d'environ 10% entre 2 et 4 ppm (1kHz).



**Figure 3-7 :** Illustration de l'artefact lié de localisation au déplacement chimique. Le gradient de localisation appliqué selon l'axe (Ox) induit une dépendance de la fréquence de résonance à la position  $x$ . La molécule 1 de déplacement chimique  $\delta_1$  (vert) résonne à une fréquence supérieure à la molécule 2 de déplacement chimique  $\delta_2$ . Lorsque l'impulsion RF est appliquée, elle excite les fréquences de l'intervalle  $\Delta\omega$ , ce qui ne correspond pas aux mêmes positions sur l'axe des  $x$  pour les deux molécules.

### 3.4.3 Suppression de l'eau

En spectroscopie, une bonne suppression de l'eau est un élément clé pour améliorer la qualité des spectres. Généralement on place un module de suppression de l'eau en amont de la séquence de spectroscopie.

Pensé pour les acquisitions de spectroscopie avec une antenne surfacique inhomogène en  $B_1$ , le module de suppression de l'eau VAPOR (VARIABLE Pulse power and Optimized Relaxation delays, Tkac et al., 1999) est en général très efficace. Il est composé de 7 impulsions CHES (chemical shift selective) de puissances et de délais de séparation variables et de 3 modules OVS (Outer Volume Suppression). Une impulsion CHES (Haase et al., 1985) est une impulsion à  $90^\circ$  qui bascule l'aimantation d'un petit intervalle de déplacements chimiques, suivie d'un gradient de défocalisation qui déphase l'aimantation et supprime donc le signal correspondant. Pour supprimer le signal de l'eau en spectroscopie avec une antenne volumique, il faut en général appliquer plusieurs (communément 3 ou 4) impulsions CHES, souvent à angle fixe, suivies de gradients de défocalisation toujours identiques, pour atténuer correctement le signal. Avec ce schéma, si le  $B_1$  est un peu trop inhomogène, une partie de l'eau est nécessairement mal supprimée. L'avantage du module VAPOR tient donc dans sa relative insensibilité aux inhomogénéités de champ  $B_1$ , grâce à la variation optimisée des angles de bascules ainsi que des gradients de défocalisation.

## CHAPITRE 4

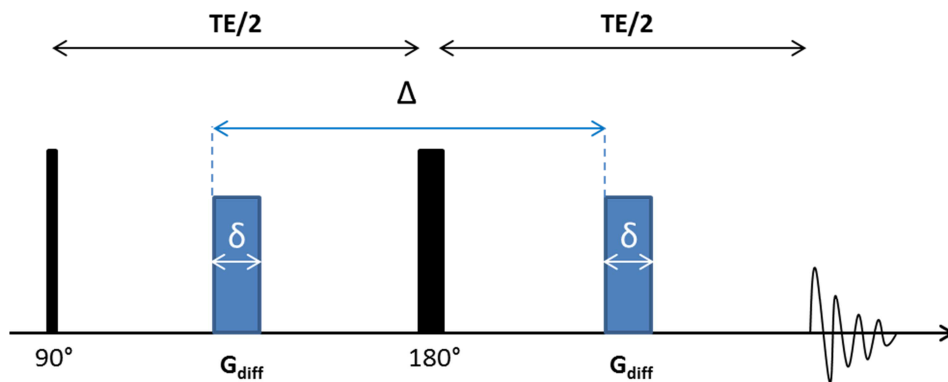
### Acquérir un spectre pondéré en diffusion

#### 4.1 Mesure de la diffusion par RMN grâce aux gradients de diffusion

La génération de scientifiques de Bloch et Purcell a décrit le phénomène de résonance magnétique nucléaire. En 1950, Hahn montre que le signal d'un écho de spin est atténué à cause de la diffusion brownienne si le champ  $B_0$  n'est pas homogène. Carr et Purcell tirent parti de cette hypothèse pour mesurer le coefficient de diffusion libre de l'eau (1954) en appliquant un gradient constant le long de  $z$ . Stejskal et Tanner proposent en 1965 l'utilisation des gradients pulsés dans un écho de spin pour mesurer la diffusion libre de l'eau et l'appliquent rapidement à la diffusion restreinte (1968).

L'imagerie du vivant vient avec la génération suivante, dans les années 1970. Lauterbur, Mansfield et Damadian, en général présentés comme les pionniers de l'IRM *in vivo*, réalisent les premières images RMN.

Pour illustrer qualitativement le principe de la mesure de diffusion, intéressons-nous à la séquence simple de Stejskal-Tanner.



**Figure 4-1** : Séquence de Stejskal-Tanner.

En général, la phase accumulée par un spin suite à l'application d'un gradient  $G$  pendant un temps  $t$  est :

$$\Phi(t) = \gamma B_0 t + \gamma \int_0^t g(t') z(t') dt' \quad (4-1)$$

### 4.1.1 Approximation des gradients courts

Pour comprendre d'abord qualitativement pourquoi la mesure RMN est sensible à la diffusion, plaçons nous dans l'approximation des gradients de diffusion infiniment courts (Price 1997, SGP,  $\delta \ll \Delta$ ), où les spins n'ont pas le temps de diffuser pendant l'application du gradient  $\mathbf{G}_{\text{diff}}$ .

La phase acquise liée à l'application du gradient de durée  $\delta$  est donc  $\Phi'(\delta) = \gamma \int_0^\delta \mathbf{G}(t) \cdot \mathbf{r} dt$ . Dans le cas d'un gradient pulsé rectangulaire classique,  $\Phi'(\delta) = \gamma \delta \mathbf{G} \cdot \mathbf{r}$ .

Après l'impulsion d'excitation à  $90^\circ$ , à l'application du premier gradient de diffusion, les spins des protons de l'échantillon de coordonnées  $\mathbf{r}_1$  acquièrent une phase  $\Phi_1 = \gamma \delta \mathbf{G} \cdot \mathbf{r}_1$ . L'impulsion à  $180^\circ$  bascule l'aimantation. A l'application du deuxième gradient, les spins des protons peuvent avoir diffusé jusqu'à une position  $\mathbf{r}_2$  et enregistrent donc une phase  $\Phi_2 = \gamma \delta \mathbf{G} \cdot \mathbf{r}_2$ . Au total, les gradients de diffusion ont induit une différence de phase de  $\Delta\Phi = \gamma \delta \mathbf{G} \cdot (\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1)$  aux spins des protons de l'échantillon. Par rapport à un écho de gradient, l'écho de spin présente l'avantage de refocaliser les dispersions de fréquence liées aux inhomogénéités de  $B_0$ , en plus de la dispersion de phase induite par le premier gradient de diffusion. Lorsque  $\mathbf{r}_1 = \mathbf{r}_2$ , les protons n'ont pas diffusé et le signal est le même. Lorsque  $\mathbf{r}_1 \neq \mathbf{r}_2$ , cela signifie que les protons ont diffusé.

Le signal  $S$  mesuré à la fin de l'acquisition représente la somme du signal de chaque spin présent dans l'échantillon. Le déphasage des spins qui ont diffusé conduisent à une atténuation globale du signal RMN par rapport au signal  $S_0$  mesuré sans l'application des gradients de diffusion. La somme (non cohérente) des contributions des  $N$  spins de l'échantillon s'écrit :

$$\frac{S}{S_0} = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N e^{i\varphi_p} \quad (4-2)$$

En passant à la limite continue, cette atténuation s'écrit :

$$\frac{S}{S_0} = \int \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i\gamma\delta\mathbf{G}\cdot(\mathbf{r}-\mathbf{r}_0)} P(\mathbf{r}|\mathbf{r}_0, t) d\mathbf{r}d\mathbf{r}_0 \quad (4-3)$$

$P(\mathbf{r}|\mathbf{r}_0, t)$  décrit la probabilité qu'un spin se trouvant en  $\mathbf{r}_0$  à  $t=0$  se trouve à la position  $\mathbf{r}$  à l'instant  $t$ . Dans le cas d'une diffusion libre, cette probabilité est décrite par l'équation 2-7. Combinée à l'équation 4-3, l'expression de l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion valable dans l'approximation des gradients courts (SGP) s'écrit :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-\gamma^2 g^2 D \delta^2 \Delta} \quad (4-4)$$



Les gradients pulsés permettent donc d'être sensible à la diffusion.

#### 4.1.2 Cas général

Les équations de Bloch-Torrey (ajout de Torrey en 1956 pour tenir compte du terme de diffusion) décrivent l'évolution de l'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}(\mathbf{r}, t)$  dans le cas général. Pour une diffusion isotropique :

$$\frac{\partial \mathbf{M}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \gamma \mathbf{M} \times \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) - \frac{M_x i + M_y j}{T_2} - \frac{(M_z - M_0) \mathbf{k}}{T_1} + D \nabla^2 \mathbf{M} \quad (4-5)$$

En négligeant la relaxation, l'évolution de l'aimantation transversale ( $M_{xy} = M_x + iM_y$ ) s'écrit :

$$\frac{\partial M_{xy}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \gamma M_{xy} \times B(\mathbf{r}, t) + D \nabla^2 M \quad (4-6)$$

Avec  $B(\mathbf{r}, t) = B_0 + \mathbf{G}(t) \cdot \mathbf{r}$ , la résolution de l'équation 4-6 donne :

$$M_{xy}(\mathbf{r}, t) = M_0 \exp\left(-i\mathbf{r} \cdot \int_0^t \mathbf{G}(t') dt'\right) \exp\left(-\gamma^2 D \int_0^t \left[\int_0^{t'} G(t'') dt''\right]^2 dt'\right) \quad (4-7)$$

A l'écho, l'intégrale  $\int_0^{TE} \mathbf{G}(t') dt'$  est nécessairement nulle. On définit le moment des gradients :

$$\mathbf{k}(t) = \gamma \int_0^t \mathbf{G}(t') dt' \quad (4-8)$$

Alors,

$$M_{xy}(\mathbf{r}, TE) = M_0 \exp\left(-D \int_0^{TE} k(t')^2 dt'\right) \quad (4-9)$$

L'expression générale de la pondération en diffusion  $b$  est :

$$b = \int_0^t k(t')^2 dt' \quad (4-10)$$

L'atténuation du signal à l'écho s'écrit donc :

$$\frac{S}{S_0} = \exp(-Db)$$

Dans le cas de l'expérience de Stejskal-Tanner,  $b = \gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)$ , avec  $t_d = \Delta - \frac{\delta}{3}$ .

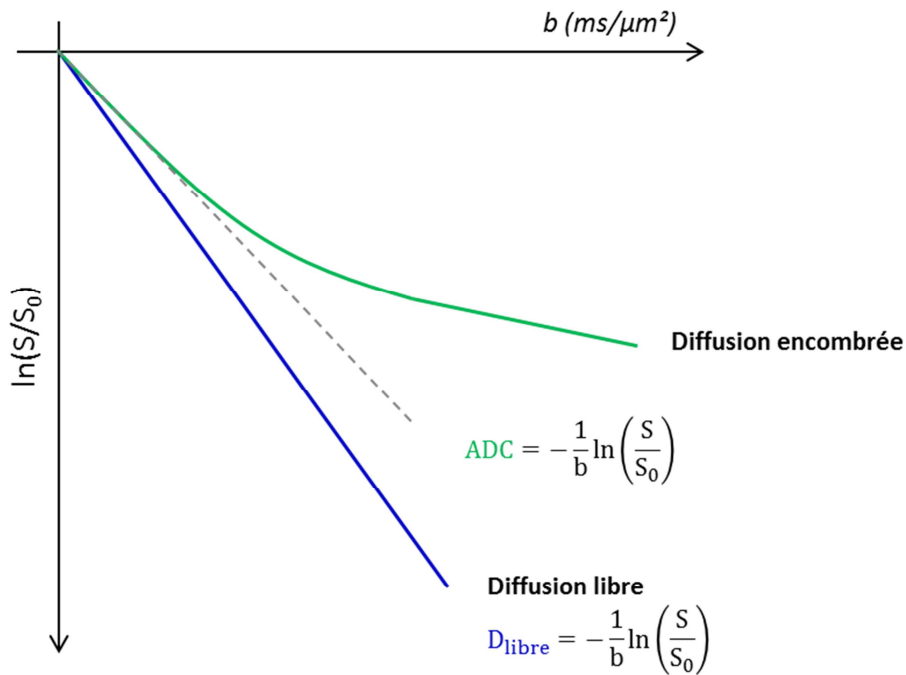
$$D'où \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\gamma^2 g^2 D \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right). \quad (4-11)$$

Avec l'approximation des gradient très courts, on retrouve  $\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\gamma^2 g^2 D \delta^2 \Delta$ .

### 4.1.3 Cas de la diffusion encombrée

La mesure de diffusion est sensible à la restriction lorsque la distance caractéristique de diffusion ( $\approx \sqrt{D\Delta}$ ) est supérieure ou égale à la taille caractéristique de la restriction (taille des pores, distance entre plans, diamètre des fibres etc).

L'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion est strictement monoexponentielle dans le cas de la diffusion libre (Figure 4-2). Dans le cas de la diffusion encombrée (restreinte, tortueuse), plus la pondération en diffusion augmente, plus l'atténuation du signal dévie de ce comportement monoexponentiel.



**Figure 4-2** : Représentation de l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion pour la diffusion libre et pour la diffusion encombrée

Par analogie avec la diffusion libre, il est encore possible d'extraire aux faibles valeurs de  $b$  le coefficient de diffusion apparent (ADC) qui caractérise au premier ordre la diffusion moyenne de la molécule dans son environnement à un temps de diffusion fixé,  $\text{ADC} \sim \frac{\langle x^2 \rangle}{2t_d}$ . Ce coefficient s'apparente donc au  $D^{\text{eff}}$  défini au chapitre 2. Il dépend essentiellement du coefficient de diffusion libre du milieu considéré

(intracellulaire pour les métabolites du cerveau) et de la tortuosité. Compte-tenu de cette quasi-linéarité, deux acquisitions suffisent pour mesurer l'ADC :

- Un spectre à  $b=0$  ms/ $\mu\text{m}^2$  donnant un signal  $S_0$ . Il est possible d'appliquer une faible pondération pour ce spectre de référence, les gradients de diffusion jouent ainsi également le rôle de spoiler.
- Un spectre à  $b \neq 0$  ms/ $\mu\text{m}^2$  donnant un signal  $S$ . La valeur de  $b$  doit rester dans un intervalle de pondération en diffusion faible, tout en donnant lieu à un contraste de diffusion suffisant.

Plus  $b$  augmente, plus la sensibilité à la restriction augmente. Le gradient dissocie des régions spatiales de plus en plus précises, donc si le temps de diffusion est choisi judicieusement, cela permet d'être sensible à certains paramètres morphologiques du milieu exploré de petite taille, comme le diamètre des processus neuronaux (axones, dendrites) ou astrocytaire, lorsqu'on étudie l'atténuation du signal dans le cerveau. L'étude méthodologique décrite dans le chapitre 6 s'appuie sur ce type de mesure et la troisième partie de ce manuscrit rapporte son application à des conditions pathologiques.

## 4.2 Le q-space

L'imagerie de diffusion et le tenseur de diffusion révèlent des contrastes de diffusion à de faibles valeurs de pondération en diffusion et donnent notamment accès à l'ADC en calculant l'atténuation du signal  $\frac{S}{S_0} = \exp(-b \cdot \text{ADC})$ . Aux faibles valeurs de  $b$ , l'atténuation du signal est monoexponentielle. En augmentant les valeurs de pondération en diffusion, l'atténuation du signal dévie du comportement monoexponentiel (Figure 4-2), à cause de la sensibilité accrue à la restriction avec l'augmentation de  $b$ .

Plusieurs approches sont possibles pour analyser ces données riches en informations.

- Les ajustements multi-exponentiels

L'ajustement bi-exponentiel a été largement utilisé, pour mettre en avant une composante rapide de la diffusion et une composante lente, reflétant la restriction du milieu dans lequel la molécule évolue. Pour la diffusion de l'eau, ces composantes sont parfois interprétées comme étant les composantes extracellulaire et intracellulaire.

- Le q-space

Pour acquérir une image par résonance magnétique, l'espace  $\mathbf{k}$  est parcouru ( $\mathbf{k} = \frac{\gamma \mathbf{G}_{\text{im}} t}{2\pi}$ ) et l'image est reconstruite dans l'espace des positions par transformée de Fourier.  $\mathbf{k}$  est le conjugué de la position  $\mathbf{r}$ .

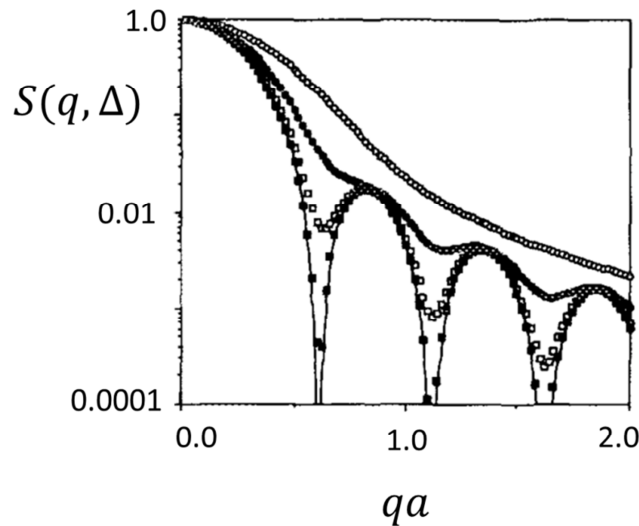
Lorsque des gradients de diffusion  $\mathbf{g}$  de durée  $\delta$  sont introduits dans une séquence, cela induit un contraste de diffusion.  $\mathbf{q} = \frac{\gamma\mathbf{g}\delta}{2\pi}$  est le vecteur conjugué du déplacement dynamique  $\mathbf{r} - \mathbf{r}_0$ . Sous l'approximation SGP ( $\delta \ll \Delta$ ),

$$S(\mathbf{q}) = \int \rho(\mathbf{r}) \int P_s(\mathbf{r}' - \mathbf{r}, \Delta) \exp(i2\pi\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}' - \mathbf{r})) d\mathbf{r}' d\mathbf{r} \quad (4-12)$$

En parcourant l'espace  $\mathbf{q}$ , c'est-à-dire principalement en augmentant l'intensité des gradients de diffusion, la transformée de Fourier donne accès à la probabilité de déplacement des molécules et donc à leurs propriétés de diffusion (Callaghan et al., 1988).

Le  $q$ -space a notamment montré une grande utilité dans l'étude des structures pseudo-périodiques comme les matériaux poreux (Callaghan et al., 1991). Pour extraire des paramètres de structure, il faut que le temps de diffusion (proche de  $\Delta$  si  $\delta \ll \Delta$ ) soit suffisamment long pour que les particules aient eu le temps de sonder l'espace et de rebondir plusieurs fois sur les parois délimitant l'espace de la restriction. Considérant «  $a$  » comme paramètre d'extension spatiale de la structure (diamètre d'une sphère, distance entre deux plans, diamètre d'un cylindre), il faut que  $\Delta > a^2/2D$ .

L'espace  $q$  contient donc de l'information sur la structure. Dans le cadre d'une structure périodique dont les parois sont parfaitement perméables (absence d'échange), l'étude de l'atténuation du signal en fonction de  $q$  fait apparaître un phénomène de diffraction (Figure 4-3).

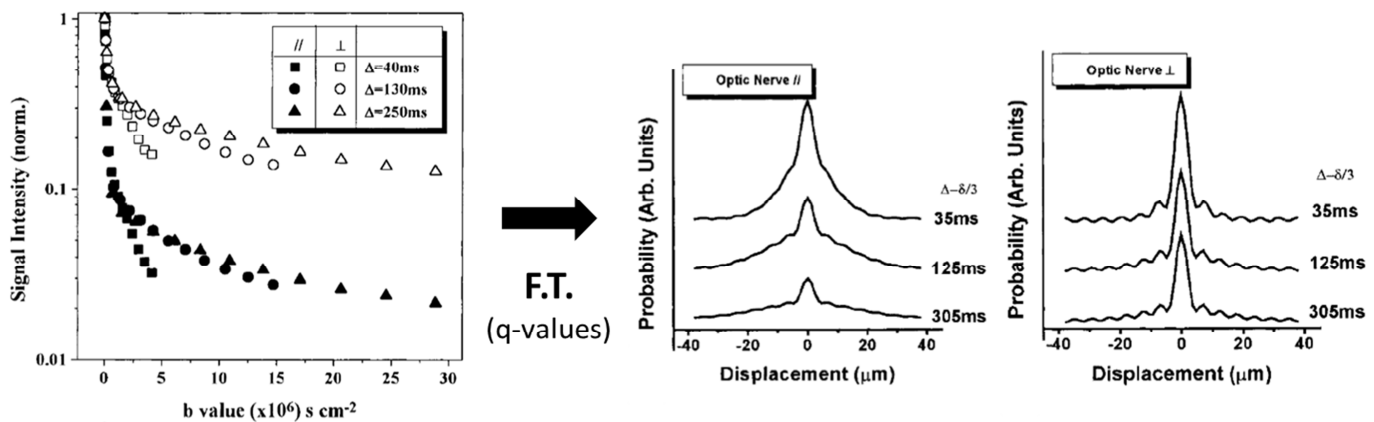


**Figure 4-3:** Simulation de l'atténuation de l'écho pour un système de cylindres de rayon  $a$ , aux parois parfaitement réfléchissantes, à différents temps de diffusion (ronds blancs,  $0.2a^2/D$  ; ronds noirs,  $0.5a^2/D$  ;

carrés blancs,  $a^2/D$  ; carrés noirs,  $2.0a^2/D$ ). La ligne continue représente le schéma de diffraction pour un temps de diffusion infini. Le gradient de diffusion est appliqué perpendiculairement aux pores (Extrait de Callaghan 1995, Figure 1-b).

Ce phénomène de diffraction permet d'extraire avec précision des longueurs caractéristiques de la microstructure. Dans un échantillon hétérogène ou dans un échantillon où les parois sont perméables, cette propriété disparaît, même si ce dernier est simplement composé de cylindres de diamètres différents. Kuchel et al. (1996) ont réussi à extraire des grandeurs caractéristiques des globules rouges, mais dans un système aussi hétérogène que le cerveau, il n'est pas possible d'utiliser le principe de diffusion-diffraction, même dans les zones les plus homogènes, comme les fibres de matière blanche.

Cependant, il est toujours possible d'étudier l'atténuation du signal en fonction de  $q$  (ou de  $b$ ). La transformée de Fourier de l'atténuation du signal donne toujours accès à la probabilité de déplacement et la sensibilité à la restriction est bonne aux hautes valeurs de  $b$ . Par exemple dans l'étude de Assaf et Cohen (2000), la probabilité de déplacement pour une pondération en diffusion appliquée parallèlement ou perpendiculairement à nerf optique bovin est très différente et reflète bien la restriction dans le plan perpendiculaire aux fibres (Figure 4-4).



**Figure 4-4 :** Atténuation du signal à différents temps de diffusion pour une pondération de diffusion appliquée parallèlement ou perpendiculairement aux fibres (gauche). Transformée de Fourier de ces courbes, relativement à la valeur  $q$ . (Extrait et adapté de Cohen et Assaf, 2000, Figure 1-b et 2-b,c). Le déplacement moyen extrait est autour de  $2 \mu\text{m}$  (calculé selon Cory et Garroway, 1990).

Dans nos études, nous pouvons en général utiliser  $q$  ou  $b$  pour étudier l'atténuation du signal, notamment celle des métabolites intracellulaires, qui donnent une information directement sur la restriction des fibres dans lesquelles ils diffusent.

### 4.3 Le tenseur de diffusion

En milieu anisotrope (Figure 4-4, exemple du nerf optique), la valeur du coefficient de diffusion  $D_{\text{eff}}$  estimé dans le voxel d'une image varie selon la direction du gradient de diffusion appliqué. Le tenseur de diffusion  $\mathbf{D}^{\text{eff}}$  est rapidement proposé pour tenir compte de l'anisotropie. Basser, Mattiello et Le Bihan établissent en 1993 une relation explicite entre le tenseur de diffusion libre et l'atténuation du signal à l'écho pour une séquence PGSE en partant des équations de Bloch avec diffusion :

$$\ln\left(\frac{S(\text{TE})}{S(0)}\right) = -\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{i,j} D_{i,j}^{\text{eff}} = -\mathbf{b} : \mathbf{D}^{\text{eff}} \quad (4-13)$$

Cette relation linéaire entre  $\ln\left(\frac{S(\text{TE})}{S(0)}\right)$  et chaque composante de  $\mathbf{D}^{\text{eff}}$ ,  $D_{i,j}^{\text{eff}}$ , permet d'étudier la contribution à l'atténuation de l'écho d'une composante à la fois, en appliquant un gradient le long de cette direction et donc de mieux caractériser l'anisotropie en précisant, par exemple, l'orientation des fibres *in vivo*. Pour mesurer intégralement  $\mathbf{D}^{\text{eff}}$ , 7 mesures indépendantes (directions de gradients non colinéaires) suffisent. De plus la matrice  $\mathbf{b}$  ainsi définie tient compte de tous les termes croisés :

$$\mathbf{b} = \gamma^2 \int_0^{\text{TE}} \left[ \mathbf{F}(t') - 2H\left(t' - \frac{\text{TE}}{2}\right) \mathbf{f} \right] \times \left[ \mathbf{F}(t') - 2H\left(t' - \frac{\text{TE}}{2}\right) \mathbf{f} \right]^T dt' \quad (4-14)$$

$\mathbf{F} = \int \mathbf{G}_{\text{diff}}(t') dt'$  et  $\mathbf{f} = \mathbf{F}\left(\frac{\text{TE}}{2}\right)$ .  $H$  est la fonction de Heaviside ( $H(x < 0) = 0$  ;  $H(x \geq 0) = 1$ ).

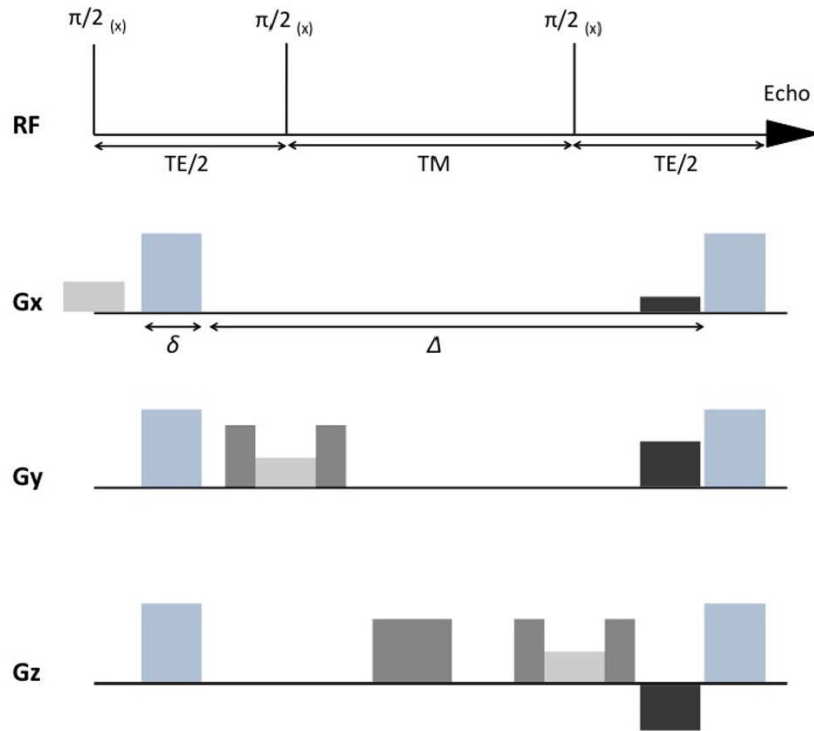
A l'échelle microscopique, la diffusion est anisotrope dans le cerveau. En imagerie de diffusion, où la résolution est bonne, le gain d'information est important lorsqu'une multitude de directions est acquise. En spectroscopie pondérée en diffusion chez l'humain, même si la résolution n'est pas très bonne, il est possible de définir de petits voxels par rapport à la taille du cerveau et donc d'être sensible à des régions très anisotropiques comme le corps calleux (Ronen et al., 2014).

Les volumes des voxels que nous utilisons pour les études de spectroscopie de diffusion présentées dans ce manuscrit sont très gros par rapport à la taille des cerveaux considérés et sont constitués de plusieurs structures (striatum, thalamus, hippocampe, etc). De plus le cerveau des rongeurs et plus particulièrement de la souris est principalement composé de matière grise. C'est la matière blanche, et ses nombreux tracts d'axones, qui est la principale source d'anisotropie mésoscopique.

Ces observations nous permettent de considérer que la diffusion est isotrope dans nos grands voxels d'intérêt, et nous l'avons notamment vérifié avec la séquence STELASER, décrite en Partie 2.

### 4.4 Les termes croisés

La séquence classique d'écho stimulé utilisée en spectroscopie large voxel est la STEAM (stimulated echo acquisition mode 90°-TE/2-90°-TM-90°-TE/2-acq) qui permet de localiser un voxel en couplant les trois impulsions radiofréquences à 90° avec des gradients d'imagerie. En ajoutant des gradients de diffusion dans chaque demi-temps d'écho, on pondère la séquence en diffusion (DW-STEAM, pour « diffusion-weighted » STEAM, Figure 4-6).



**Figure 4-6** : Séquence STEAM pondérée en diffusion (DW STEAM) avec les gradients de localisation (gris clair), de refocalisation (noir), de crushers (gris foncé) et les gradients de diffusion (bleu). Extrait du manuscrit de thèse de Chloé Najac, 2014.

Sur un écho stimulé ainsi pondéré en diffusion, la pondération en diffusion  $b$  a souvent été calculée en négligeant la contribution des gradients d'imagerie et des crushers. L'expression de  $b$  est alors :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left( \Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (4-15)$$

Le temps de diffusion correspond ici à  $t_d = \Delta - \frac{\delta}{3} \sim TE + TM - \frac{\delta}{3}$ .

A temps d'écho court et à temps de diffusion intermédiaire,  $\Delta$  dépend donc essentiellement du temps de mélange. Pour augmenter la pondération en diffusion maximale atteignable  $b_{\max}$ , il est possible de jouer sur  $\delta$  et  $\Delta$ ,  $G$  étant bien entendu fixé à son amplitude limite  $G_{\max}$ . Augmenter  $\delta$  est une possibilité dans

une moindre mesure car d'une part l'allongement de  $\delta$  oblige à allonger le temps d'écho et d'autre part garder longtemps le gradient à son amplitude maximale risque de causer un problème de duty cycle. Augmenter  $\Delta$  permet d'améliorer sensiblement  $b_{\max}$  sans perdre trop de signal, car la relaxation longitudinale de temps  $T_1$  des métabolites est beaucoup plus lente que la relaxation transversale de temps  $T_2$ , donc plus favorable. Cependant si le temps de diffusion augmente trop, on perd la sensibilité aux petites échelles de restriction gagnée grâce aux hautes valeurs de pondération en diffusion.

L'inconvénient majeur de cette séquence est la dépendance de la pondération en diffusion aux gradients d'imagerie, aux crushers et aux gradients de refocalisation insérés dans le temps d'écho, désignés par  $\mathbf{G}_{\text{autres}}$  pour la clarté de l'explication subséquente. Il faut donc tenir compte du gradient  $\mathbf{G}_{\text{tot}} = \mathbf{G}_{\text{diff}} + \mathbf{G}_{\text{autres}}$  pour calculer  $\mathbf{k}(t) = \int_0^t \mathbf{G}_{\text{tot}}(t') dt'$ .

$$b = \gamma^2 \int_0^{\text{TE}} k^2(t') dt' = \gamma^2 \int_0^{\text{TE}} \left[ \int_0^{t'} (\mathbf{G}_{\text{diff}}(t'') + \mathbf{G}_{\text{autres}}(t'')) dt'' \right]^2 dt' \quad (4-16)$$

$$\propto G_{\text{diff}}^2 + G_{\text{autres}}^2 + \mathbf{G}_{\text{diff}} \cdot \mathbf{G}_{\text{autres}}$$

- Cas de l'étude de l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion,  $t_d$  fixé.

La contribution brute  $G_{\text{autres}}^2$  est toujours la même, quel que soit la pondération en diffusion. La contribution des termes dits « croisés »  $\mathbf{G}_{\text{diff}} \cdot \mathbf{G}_{\text{autres}}$  augmente avec la pondération en diffusion, ce qui induit un biais sur l'atténuation du signal qui ne correspond pas à un simple décalage (que cause  $G_{\text{autre}}^2$  par exemple).

- Cas de l'étude de l'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion.

La pondération en diffusion dépend de  $\Delta \sim \text{TE} + \text{TM}$ . Ne pas tenir compte les termes croisés dans le calcul de  $b$  conduit à une surestimation de plus en plus importante de l'ADC lorsque  $\Delta$  augmente, puisque la contribution relative des gradients de diffusion diminue. Le chapitre 6 (§6.4) décrit notamment des mesures acquises entre  $t_d=50$  ms et  $t_d=2000$  ms. Très vite, la contribution des gradients de diffusion est minoritaire par rapport aux gradients d'imagerie fixés quel que soit le temps de diffusion.

Il est bien entendu possible d'établir l'expression exacte de la pondération en diffusion en tenant compte des gradients  $\mathbf{G}_{\text{autres}}$  pour corriger ce biais. Cependant les gradients de sélection de coupe participant aux termes croisés ont des évolutions temporelles toutes différentes et déterminer rigoureusement le vrai temps de diffusion est très compliqué (voire non déterminable). Une autre solution est d'acquérir pour chaque pondération en diffusion deux spectres en inversant la polarité des gradients de diffusion (Neeman et al., 1991 ; Najac et al., 2014).



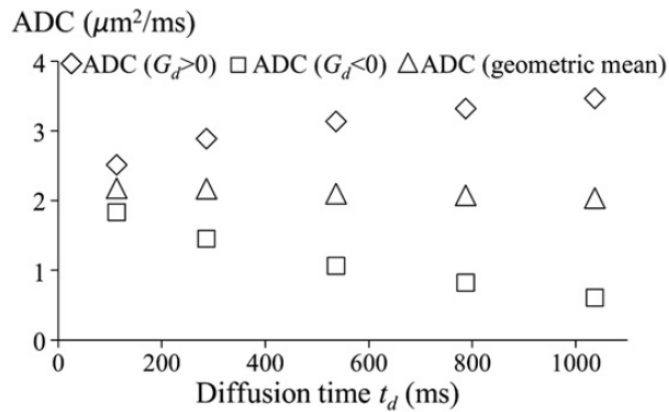
Pour chaque mesure :

$$b_+ \sim G_{\text{diff}}^2 + G_{\text{autre}}^2 + \mathbf{G}_{\text{diff}} \cdot \mathbf{G}_{\text{autres}} \text{ pour l'acquisition avec la polarité positive}$$

$$b_- \sim G_{\text{diff}}^2 + G_{\text{autre}}^2 - \mathbf{G}_{\text{diff}} \cdot \mathbf{G}_{\text{autres}} \text{ pour l'acquisition avec la polarité négative}$$

En calculant la moyenne géométrique de l'atténuation du signal :

$$\sqrt{\frac{S_+ S_-}{S_0^2}} = \exp(-b_{\text{tot}} \cdot \text{ADC}) \text{ et } b_{\text{tot}} = \frac{b_+ + b_-}{2} \text{ ne dépend plus des termes croisés.}$$



**Figure 4-7** : Effet de la correction des termes croisés (extrait de Najac et al., 2014) en prenant la moyenne géométrique de deux acquisitions à polarités opposées réalisées avec la séquence STEAM sur un fantôme d'agarose (chapitre 5) pour des temps de diffusion variant entre 86 ms et 1011 ms.

Cette technique permet également de supprimer les termes croisés liés aux gradients inconnus (mais constants) de susceptibilité magnétique dans l'échantillon (Figure 4-7), à condition de supposer que le voxel est homogène et que l'atténuation du signal est monoexponentielle (diffusion libre ou petites valeurs de  $b$ ).

# **PARTIE 2**

## **LA DIFFUSION**

### **A TOUTES LES ECHELLES**

#### **DANS LE CERVEAU DE RONGEUR**



Dans cette partie nous décrivons les méthodes développées au cours de la thèse pour l'exploration des temps de diffusion allant de 0.2 ms à 2 s et correspondant à des distances de diffusion caractéristiques comprises entre 0.4 et 20  $\mu\text{m}$ . Ces développements s'insèrent dans la continuité des travaux méthodologiques réalisés par Charlotte Marchadour (temps de diffusion courts) et Chloé Najac (temps de diffusion longs).

Mais tout d'abord, avant d'étudier l'évolution de l'ADC des métabolites en fonction du temps de diffusion, nous explorons dans cette partie l'atténuation du signal des mêmes métabolites aux très hautes valeurs de pondération ( $b_{\text{max}}=60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) à un temps de diffusion intermédiaire de 63.2 ms, en utilisant une séquence que nous introduisons (séquence « STELASER ») (chapitre 6). La distance de diffusion caractéristique associée est d'environ 4  $\mu\text{m}$  et permet théoriquement d'être sensible au diamètre des fibres dans lesquelles les métabolites diffusent. Nous profitons de la bonne qualité des acquisitions aux hautes valeurs de pondération en diffusion pour étudier la potentielle dépendance à la relaxation du signal mesuré en spectroscopie de diffusion et vérifier que nous pouvions interpréter nos mesures en fonction de la géométrie cellulaire. La même séquence, qui n'induit pas de termes croisés, est ensuite utilisée pour mesurer l'ADC aux temps de diffusion très longs (chapitre 6).

A temps de diffusion très courts, nous avons développé une stratégie permettant de réduire le temps d'écho tout en gardant une pondération suffisante pour assurer un bon contraste de diffusion (chapitre 7) et nous avons repoussé les limites des temps de diffusion très courts grâce à un gradient très intense (1.5 T/m).

En général, les résultats obtenus en spectroscopie de diffusion sont interprétés en considérant que c'est la géométrie restrictive de l'environnement qui domine les autres phénomènes potentiels (échange chimique, transport transmembranaire...). La façon dont ces résultats peuvent être modélisés afin d'extraire les paramètres morphologiques des neurones et astrocytes est discutée dans le chapitre 8.

## CHAPITRE 5

### Méthodes communes des expériences RMN

---

Afin de ne pas avoir à détailler pour chaque chapitre les méthodes d'acquisition et d'analyse des spectres, qui sont en général assez semblables, nous les détaillons dans un chapitre dédié. Le lecteur pressé peut passer ce chapitre, mais nous conseillons au moins la lecture des points 5.2.1 et 5.3.1 qui traitent de l'importance du rephasage individuel et de la prise en compte des macromolécules. Ces méthodes ne sont pas toujours appliquées dans la littérature et sont pourtant cruciales, notamment en spectroscopie pondérée en diffusion.

#### 5.1 Hardware et expérimentation animale

##### 5.1.1 11.7 T

Le scanner IRM 11.7 T Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) est un aimant horizontal dédié uniquement à l'étude des rongeurs. Le gradient préclinique dont il est pourvu peut atteindre une intensité maximale de 752 mT/m en un temps de montée de 100  $\mu$ s. Nous disposons également d'une antenne émettrice/réceptrice cryogénique en quadrature de phase adaptée aux souris. Le refroidissement de l'antenne diminue le bruit électronique. La surface de l'antenne en contact avec l'animal est maintenue à 37°. Le gain en signal à bruit est d'environ 3 par rapport à une antenne de surface classique. Le shim de ce scanner se détériorant assez facilement, nous avons réalisé les acquisitions de manière à pouvoir reshimer régulièrement (toutes les 20-30 min). Les séquences sont implémentées sous Paravision 6.0.1.

Toutes les études de ce manuscrit présentées à 11.7 T ont été réalisées sur souris, avec l'antenne cryogénique.

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane, un agent anesthésique volatil (éther halogéné), dans un mélange d'air et d'oxygène. L'utilisation de l'isoflurane est souvent contestée dans le cadre d'études métaboliques, car il a un impact sur le métabolisme. Pour les études de diffusion, une étude de Valette et al. (2007) montre une dépendance de l'ADC à la dose d'isoflurane. A 2% d'isoflurane, les coefficients de diffusion apparents des métabolites est plus important qu'à 1%, notamment pour les composés cholinergiques (+50%). Le stage de master II de Chloé Najac tend à montrer qu'il y a un effet seuil autour de 1.5% d'isoflurane, et que l'ADC des métabolites augmente à partir de cette dose. Nous avons donc toujours veillé à anesthésier les souris à moins de 1.5% d'isoflurane. En moyenne, 1.3% suffit à garder une souris stable dans l'IRM.

Si l'expérience doit durer longtemps (partie 3), la souris est préalablement hydratée avec une injection de sérum physiologique en sous-cutanée. Si les souris étaient pucées, elles sont bien entendu dépucées pour éviter toute source d'artefact.

Un cadre stéréotaxique avec mors et barres d'oreilles est utilisé pour limiter au maximum les mouvements de l'animal dans le scanner.

Les souris sont maintenues à 37° grâce au lit qui est chauffé par circulation d'eau chaude ainsi qu'un pad posé sur le corps de la souris. La tête de la souris est également maintenue directement à température grâce à l'antenne cryogénique.

Tout au long de l'expérience, la respiration et la température de la souris sont monitorées.

Une petite bouillotte d'eau chaude est utilisée pour maintenir l'animal au chaud pendant la période de préparation et pendant la phase de réveil. Sans cela, en une demi-heure (temps d'anesthésie, de stéréotaxie et de mise en place dans l'IRM), la température corporelle de la souris descend facilement à 30°.

La fréquence de résonance de l'eau est sensible à la température ( $\sim 0.01 \text{ ppm}/^\circ$ , soit environ  $5 \text{ Hz}/^\circ$  à 11.7 T; *In Vivo NMR Spectroscopy, Principles & Techniques*, de Graaf p.43), il est donc important de conserver une température stable d'une part pour la santé de l'animal et d'autre part pour éviter la dérive fréquentielle entre l'eau et les métabolites (le navigateur recale en fréquence à chaque acquisition, mais sur la fréquence de résonance des protons de l'eau).

### **5.1.2 7 T**

Le scanner IRM 7 T (Varian/Agilent) est un aimant horizontal préclinique adapté à l'étude des macaques. Une seule série d'expériences (5.7) a été réalisée sur ce scanner et les méthodes spécifiques sont décrites dans cette partie.

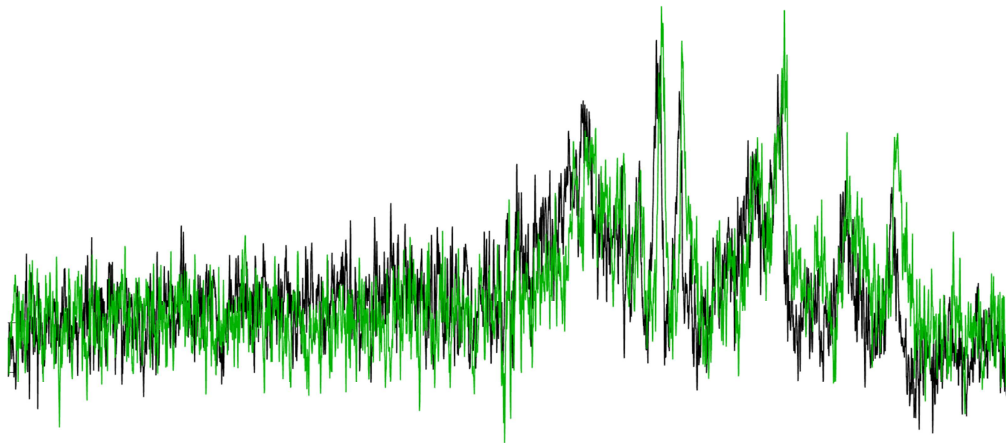
## **5.2 Post-processing**

En spectroscopie RMN pondérée en diffusion, plus la pondération est forte, plus le signal des métabolites est atténué. Le voxel d'intérêt doit donc être d'autant plus grand afin de compenser la perte de signal liée à la diffusion. Pour obtenir des spectres pondérés en diffusion de la meilleure qualité possible, la taille minimale du voxel que nous acceptons doit pouvoir permettre de détecter du signal de métabolites sur une seule répétition avec pondération. Cela se traduit notamment par un signal à bruit minimum de 5 sur le pic du tNAA ou de la tCr avec un linebroadening de 3 sur une répétition. Ce critère peut-être perçu comme contraignant, mais il est essentiel pour pouvoir rephaser chaque spectre individuellement.

### 5.2.1 Rephasage individuel

Les spectres sont enregistrés individuellement, à chaque répétition. Le signal à bruit minimum accepté pour une répétition est de 5 sur le pic du tNAA ou de la tCr avec un linebroadening de 3. Cela permet d'avoir un signal suffisant pour rephaser individuellement chaque spectre.

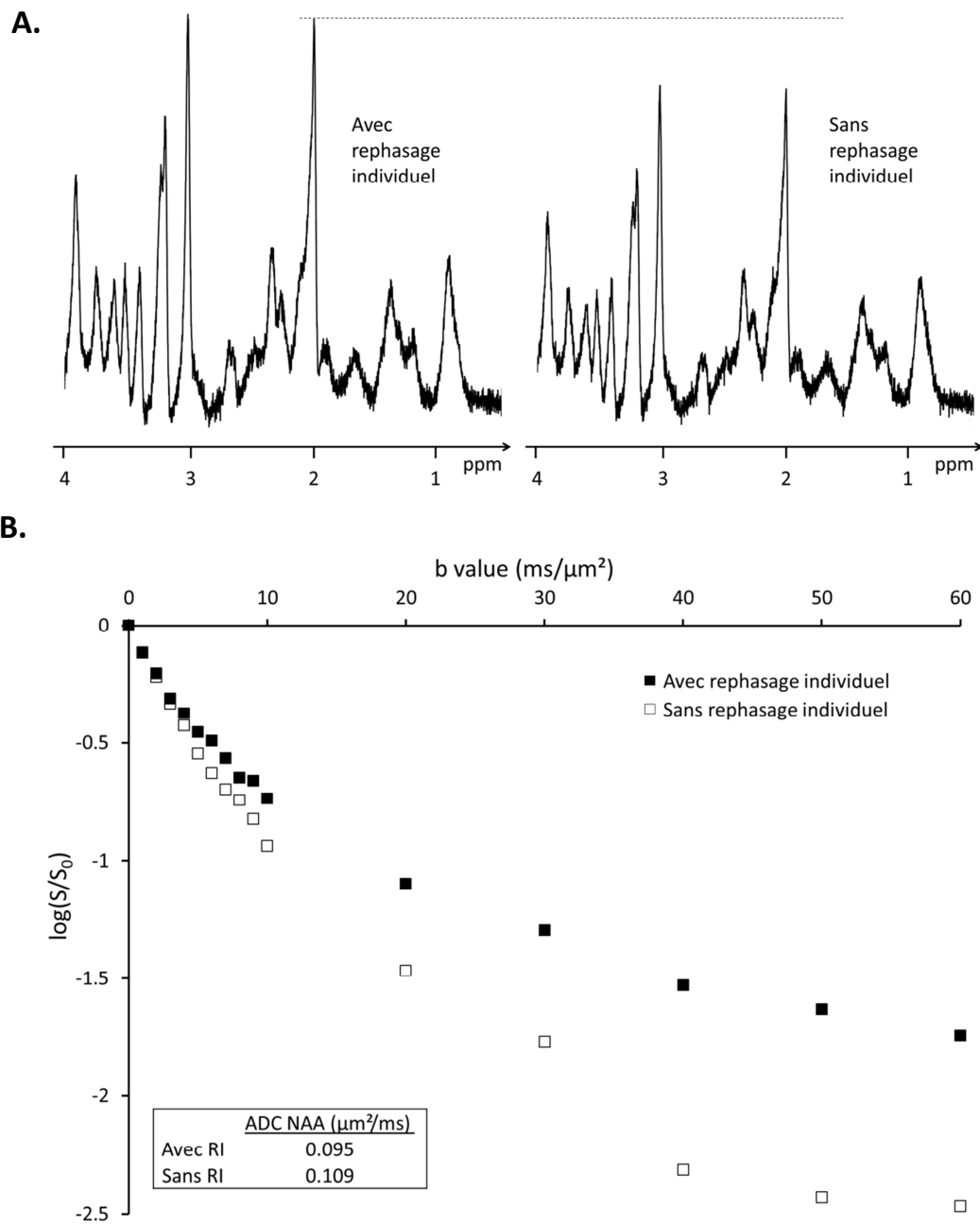
D'une répétition à l'autre, une variation de la phase du spectre peut en effet avoir lieu. Même subtile, cette variation peut entraîner une mauvaise estimation du signal total si les répétitions uniques sont sommées entre elles sans en tenir compte. De plus le spectre final est moins bien résolu car le décalage en fréquence entraîne nécessairement un élargissement des pics (Figure 5-1).



**Figure 5-1** : exemple de différence de phase entre deux répétitions (8<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup>) d'une acquisition de 32 répétitions, à une pondération en diffusion  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , avec un linebroadening de 8. Le décalage en fréquence et en phase induit une perte de signal à la somme.

Cette précaution est d'autant plus importante en spectroscopie de diffusion, car la déviation de phase augmente généralement avec l'intensité des gradients appliqués. L'étude de l'atténuation du signal à de très hautes valeurs de pondérations en diffusion est un exemple particulièrement frappant de l'importance du rephasage individuel.

L'atténuation du signal en fonction de  $b$  (Figure 5-2) est largement surestimée aux hautes valeurs de pondération en diffusion et est détectable dès  $b=2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . La valeur de l'ADC, évaluée ici entre  $b=0$  et  $b=5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  est surestimée en l'absence de rephasage individuel.



**Figure 5-2** : exemple de l'importance de la perte de signal causée par un manque de rephasage individuel. Le jeu de données est acquis en une expérience et est issu de l'étude décrite dans le chapitre 6 (STELASER, TE/TM/TR=33.4/60/2000 ms) A) Spectre acquis en 128 répétitions à  $b=10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , avec et sans rephasage individuel B) Atténuation du signal du NAA entre  $b=0$  et  $b=60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , avec et sans rephasage individuel.



## 5.2.2 Les courants de Foucault

Lorsqu'un champ magnétique varie au cours du temps au milieu d'un matériau conducteur, cela peut induire des courants électriques de Foucault (Eddy current en anglais). Ces courants électriques induisent à leur tour un champ magnétique qui vient s'opposer au champ pré-existant, ce qui provoque des distorsions dans des spectres localisés acquis avec des gradients d'imagerie. Aux hautes valeurs de pondérations en diffusion, ou aux temps diffusion courts (gradients oscillants, chapitre 7) s'ajoutent les gradients de diffusion qui peuvent également induire des courants de Foucault. Bien que nous n'ayons pas réellement observé de distorsion liée aux courants de Foucault sur les spectres, ces derniers sont corrigés suivant la méthode de Klose proposée en 1990, qui nécessite l'acquisition d'un spectre sans suppression de l'eau, tous paramètres égaux par ailleurs.

## 5.2.3 Suppression du résidu d'eau

Lorsque la suppression de l'eau n'est pas bonne, la ligne de base du spectre est tordue et les métabolites proches de la résonance de l'eau sont parfois difficiles à quantifier. Au cours de la thèse, nous avons optimisé la suppression de l'eau, mais selon la séquence ou le temps de diffusion étudié, le résidu d'eau peut rester important.

Pour supprimer a posteriori un résidu d'eau trop important, il est possible d'extraire, grâce à une décomposition en valeurs singulières (Barkhuysen et al., 1987), le résidu d'eau et les éventuels lobes secondaires.

## 5.2.4 LCModel

Une fois toutes les étapes précédentes réalisées en routine sous Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA), la FID modifiée est enregistrée et les spectres sont quantifiés sous LCModel (Provencher, 1993). Pour chaque séquence et chaque combinaison de paramètres TE/TM, une base différente est générée sous Matlab par simulation de la matrice de l'opérateur densité. Les déplacements chimiques et les constantes de couplages sont issus de Govindaraju et al. (2000) ainsi que l'addendum de 2015, particulièrement pour GABA. Nous avons également adapté le déplacement chimique de référence de la taurine, car cette dernière était constamment légèrement décalée vers la choline dans le fit LCModel, ce qui est une source de biais dans la quantification. La résonance des deux groupements CH<sub>2</sub> est indiquée à (3.2459 ppm, 3.4206 ppm), nous l'avons modifiée à (3.253 ppm, 3.421 ppm). L'analyse est effectuée entre 0.4 et 4 ppm.

Les métabolites utilisés dans les bases simulées sont : l'acetate (Ace), l'alanine (Ala), l'aspartate (Asp), la choline (Cho), la créatine (Cr), l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), le glucose (Glc), la glutamine (Gln), le

glutamate (Glu), la glycine (Gly), la glycérophosphorylcholine (GPC), le glutathion (GSH), le myo-inositol (Ins), le scyllo-inositol (sIns), le lactate (Lac), le N-acétylaspartate (NAA), l'acide N-acétylaspartylglutamique (NAAG), la phosphorylcholine (PCho), la phosphocréatine (PCr) et la phosphatidyléthanolamine (PE). Les macromolécules (MM) sont acquises expérimentalement et intégrées aux bases LCMoDel.

Les métabolites suivants ne participent en général pas au fit, car leurs concentrations sont supposées trop faibles ou leurs contributions sont mal définies et se superposent avec des résonances importantes : Cho, Glc, Gly, PE.

Certains métabolites sont étudiés ensemble :  $tNAA=NAAG+NAA$ ,  $tCr=PCr+Cr$  (créatine totale),  $tCho=Cho+GPC+PCho$  (composés cholinergiques). Il est courant de regrouper également Glu et Gln, mais nous sommes en général en mesure de les étudier individuellement. Des contraintes sont imposées sur le scyllo-inositol ( $sIns/tCr=0.02$ ) et les composés cholinergiques dont les résonances sont très superposées ( $PCho/GPC=0.5$ ).

Seuls les métabolites avec un Cramér-Rao Lower Bound (CRLB, erreur sur la valeur absolue de la concentration indiquée par LCMoDel) inférieur à 5% sont pris en compte pour les études de diffusion. C'est toujours le cas pour le tNAA, la tCr, la Tau, l'Ins et les tCho. Le Glu aussi généralement, sauf dans le chapitre 7, où le temps d'écho n'est pas adapté. Lorsque le temps d'écho est court et le temps de diffusion pas trop long, les macromolécules sont bien quantifiées.

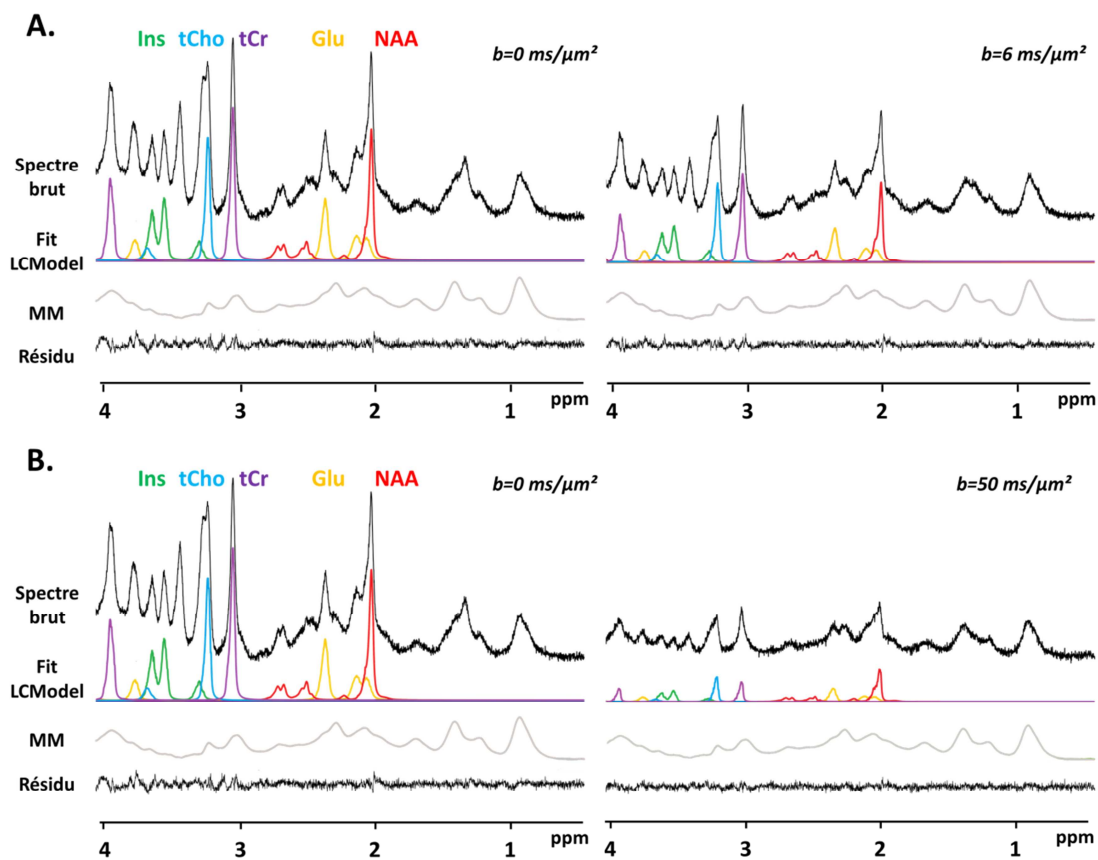
Enfin, pour tous les spectres analysés sous LCMoDel, l'allure générale du fit et de la ligne de base ainsi que le déplacement chimique du NAA à 2 ppm sont des indicateurs rapides de la qualité de l'analyse LCMoDel.

### **5.3 Importance des macromolécules et acquisition des spectres de MM**

#### **5.3.1 Nécessité d'évaluer les macromolécules**

A des temps d'écho courts, l'excitation non sélective des métabolites donne accès à un grand nombre de métabolites et excite aussi les macromolécules. Les macromolécules contribuent au spectre par des résonances larges et mal définies, superposées aux métabolites et il est difficile de savoir à quoi correspondent exactement ces macromolécules. Elles correspondent probablement à toutes les grosses molécules et protéines qui contiennent toutes les mêmes acides aminés qui résonnent légèrement différemment selon les protéines auxquels ils appartiennent. Leurs  $T_2$  sont très courts ( $T_{2,MM} \sim 20-30$  ms à 11.7 T, de Graaf et al. 2006), elles disparaissent donc rapidement du spectre avec l'augmentation du temps d'écho.

Leur diffusivité est également très faible ( $0.006 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  mesurée entre  $b=0$  et  $b=50 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  par une approximation affine par Pfeuffer en 2000) et donc leur contribution au signal total est très importante, notamment aux hautes valeurs de pondération en diffusion (Figure 5-3). La résonance à 0.9 ppm qui se détache du reste du spectre, n'est superposée à aucun métabolite : ce pic est de même intensité que le NAA à  $b=50 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Il n'est pas déraisonnable de supposer que les résonances des MM superposées aux métabolites contribuent similairement au spectre. La base de macromolécules insérée dans LCMModel doit donc absolument refléter au mieux ces résonances larges et il n'est pas évident de l'acquérir précisément et sans ambiguïté.



**Figure 5-3** : Contribution relative des macromolécules (en gris) en fonction de la pondération en diffusion entre  $b=0 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $b=6 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (A) ou  $b=50 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (B). Le jeu de données est issu du chapitre 9, d'une souris contrôlée (séquence STELASER, TE/TM/TR=33.4/50/2000 ms).

### 5.3.2 Acquisition d'un spectre de macromolécules

Dans la littérature, lorsque les MM sont prises en compte, ce qui est loin d'être toujours le cas, le spectre de macromolécules est souvent acquis par sIR (pour simple Inversion Recovery). Dans un module en

amont de la séquence (réglée avec les paramètres de TE et TM utilisés pour l'acquisition des spectres totaux), l'aimantation est totalement inversée. Comme le  $T_1$  des macromolécules est environ deux fois plus court que celui des métabolites ( $T_{1, MM} \sim 630-750$  ms à 11.7 T, de Graaf et al. 2006), la repousse des macromolécules est complète bien avant celle des métabolites. Le temps d'inversion (TI) est choisi pour que la contribution des macromolécules soit la plus faible possible, on parle de « metabolite nulling ».

Malheureusement, les  $T_1$  des métabolites sont variables (Table 5-1). A 11.7 T, la plupart des forts contributeurs (métabolites les plus concentrés) ont un  $T_1$  de l'ordre de 1500-1700 ms. Mais les protons  $CH_2$  de la tCr (4 ppm) et ceux de la taurine ont une relaxation longitudinale trop différente.

Table 5-1 :  $T_1$  des métabolites principaux du spectre proton du cerveau à 11.7 T (de Graaf et al. 2006). Ceux de la taurine et de la résonance à 4 ppm de la tCr sont très différents du reste.

	<b>NAA</b>	<b>Glu</b>	<b>Ins</b>	<b>tCho</b>	<b>tCr (3 ppm)</b>	<b>tCr (4 ppm)</b>	<b>Tau</b>
<b>T1 (ms)</b>	1714	1451	1638	1630	1767	<b>1156</b>	<b>2447</b>

En utilisant un seul TI qui annule grossièrement les résonances du NAA, Glu, Ins, tCho et tCr (3 ppm), la repousse pour les protons  $CH_2$  de la créatine totale est trop importante (contribution positive sur le spectre du métabolite) et celle de la taurine insuffisante (contribution négative sur le spectre du métabolite). Au cours de la thèse, nous avons amélioré la base de macromolécules à insérer dans LCMModel.

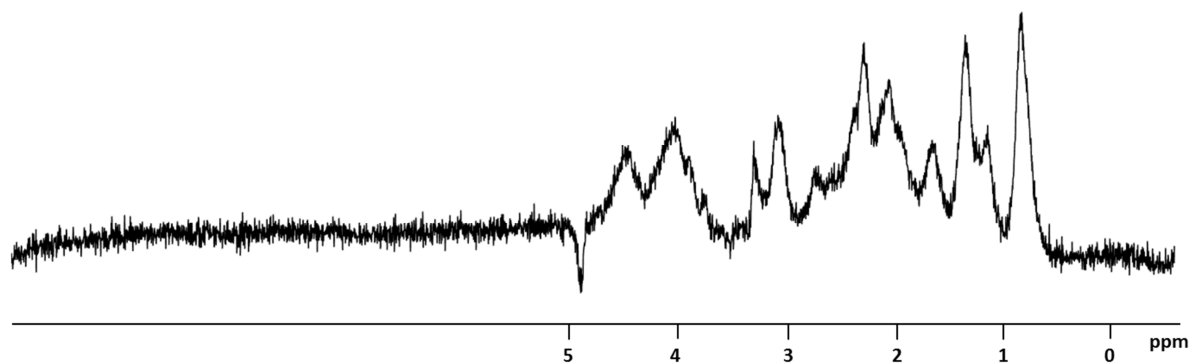
Les spectres de la Partie 2 ont été analysés avec des bases de macromolécules acquises avec la méthode suivante:

- sIR avec un TI un peu plus long pour n'avoir aucune contribution négative au spectre
- Ajout d'une pondération en diffusion  $b=10$  ms/ $\mu m^2$  pour atténuer le plus possible le signal des métabolites

Les spectres de la Partie 3 ont été analysés avec des bases de macromolécules acquises avec la méthode suivante :

- dIR (double Inversion Recovery). Le module de dIR est aussi placé en amont de la séquence et contient deux impulsions d'inversion et donc deux temps d'inversion TI1 et TI2 ( $180^\circ$ -TI1- $180^\circ$ -TI2-séquence-FID). Lopez-Kolkovsky et al. (2016) l'utilisent notamment avec succès pour l'étude des macromolécules à 17.2 T ainsi que Povazan et al. (2015). La double inversion permet de parer partiellement l'effet des différences de  $T_1$  grâce à la succession des deux repousses.

- La pondération en diffusion à  $b=10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  est conservée pour atténuer davantage le signal des métabolites.
- Les petits résidus de la tCr (4 ppm) et de la taurine très légèrement négative sont atténués en soustrayant une lorentzienne au niveau de ces résonances. Ainsi toutes les contributions des macromolécules ont une intensité au plus égale à celle de la résonance de MM à 0.9 ppm, et aucune n'est négative. Cette correction des spectres a posteriori peut également améliorer la qualité des spectres acquis avec la méthode de la Partie 2, mais il faut l'appliquer sur plus de résidus de métabolites, ce qui peut quand même être une source de biais.



**Figure 5-4** : Spectre de macromolécules (issu du chapitre 9, somme sur les 10 souris contrôle) acquis et traité selon la méthode décrite ci-dessus.

Cette dernière méthode permet d'obtenir des spectres de macromolécules de bonne qualité (Figure 5-4) pour analyser le plus justement possible les spectres pondérés en diffusion.

### 5.3.3 Limites

Le signal à bruit d'un spectre de macromolécule acquis sur un seul animal (17 min avec la double inversion:  $TR=4000 \text{ ms}/256$  répétitions) est faible. Par rapport à la résonance à 0.9 ppm la plus intense, le SNR est autour de 25 selon les conditions et donc trop faible pour intégrer le spectre tel quel à la base LCModel. Les spectres sont donc sommés sur plusieurs animaux.

La double inversion ne permet pas d'éradiquer complètement les différences liées aux différents  $T_1$ . Knight-Scott (1999) a augmenté le nombre d'inversions pour jouer au mieux avec les  $T_1$  des métabolites, mais le résultat n'est pas très concluant. La correction a posteriori des contributions des  $T_1$  les plus différents semble être une approche raisonnable, mais potentielle source de biais si la soustraction n'est pas effectuée de la même façon sur tous les spectres.

## 5.4 Les différents types de fantômes utilisés

Les fantômes sont des systèmes simples, très homogènes et bien caractérisés. Leur utilisation est indispensable pour les phases de développement et de validation d'une nouvelle séquence, ou pour des vérifications a posteriori. Il existe de nombreux fantômes, plus ou moins complexes et biomimétiques : ils peuvent être constitués de fibres pour tester la sensibilité à l'anisotropie et aux paramètres de microstructure, ou de métabolites concentrés pour tester la sensibilité à un gradient de concentration (en CEST par exemple).

La diffusion est libre dans les fantômes liquides homogènes. Trois critères sont en général vérifiés pour les séquences de spectroscopie large voxel pondérée en diffusion :

- L'atténuation monoexponentielle du signal en fonction de  $b$
- La valeur du coefficient de diffusion mesurée, en accord avec la valeur attendue
- La stabilité du coefficient de diffusion en fonction du temps de diffusion
- L'isotropie des mesures si l'hypothèse est utilisée in vivo.

### 5.4.1 L'eau

L'eau est le fantôme le plus simple. Très facilement accessible et stable dans le temps, il permet de vérifier un bon nombre de variables pour les séquences classiques. Il permet notamment de tester les séquences dédiées à l'étude des ADC aux temps de diffusion courts à intermédiaires avec des pondérations en diffusion n'excédant pas  $3 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , car le coefficient de diffusion de l'eau libre à  $20^\circ$  est à environ  $2 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , soit une valeur élevée.

Son coefficient de diffusion élevé (beaucoup plus important qu'in vivo), sa forte dépendance à la température ( $\sim 3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  à  $37^\circ$ ) et sa faible viscosité sont autant de facteurs limitant l'utilisation de l'eau comme fantôme, notamment pour étudier les très hautes valeurs de pondérations en diffusion. La potentielle présence de flux gêne son utilisation pour l'étude des très longs temps de diffusion, comme la plupart des fantômes liquides.

### 5.4.2 L'éthylène glycol

Le spectre de l'éthylène glycol est constitué de deux pics bien séparés. Sa viscosité est environ 16 fois plus grande que celle de l'eau. Son coefficient de diffusion libre est donc largement plus faible (mesuré à  $0.10 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  dans le chapitre 6). Il est particulièrement adapté à l'étude des hautes pondérations en

diffusion, avec des gradients de diffusion intenses. Dans l'étude de Spees et al. (2012), rapportant notamment l'évolution du coefficient de diffusion de l'éthylène glycol avec la température (affine entre  $\ln(D_{\text{eth}})$  et  $1/T$ ), le coefficient de diffusion mesuré à 22° est bien de 0.10  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Fantôme liquide également, il n'est pas bien adapté à l'étude des très long temps de diffusion à cause des potentiels flux.

### **5.4.3 Le gel d'agarose**

L'agarose est un polymère qui se présente sous forme de poudre. Il est lentement soluble dans l'eau chaude et forme un gel plus ou moins solide (selon sa concentration) au refroidissement. Un gel concentré à 1% fournit une matrice lâche, dans laquelle l'eau diffuse librement mais qui permet d'éviter les phénomènes de flux. Le gel d'agarose est donc particulièrement adapté à l'étude des temps de diffusion longs.

## CHAPITRE 6

### La séquence STELASER et ses applications

---

#### 6.1 Nécessité d'une nouvelle séquence par rapport à la STEAM

La séquence classique d'écho stimulé utilisée en spectroscopie large voxel est la STEAM (stimulated echo acquisition mode  $90^\circ$ -TE/2- $90^\circ$ -TM- $90^\circ$ -TE/2-acq). Elle permet de localiser un voxel en couplant les trois impulsions radiofréquences à  $90^\circ$  avec des gradients d'imagerie (chapitre 3). En ajoutant des gradients de diffusion dans chaque demi-temps d'écho, on pondère la séquence en diffusion (DW-STEAM, cf §4.4).

Un des inconvénients majeur de cette séquence est la dépendance de la pondération en diffusion aux termes croisés (cf §4.4). Pour ne plus en dépendre, il est possible d'acquérir des spectres pondérés en diffusion avec des gradients de diffusion aux polarités opposées (Neeman et al., 1991) et de considérer ensuite la moyenne géométrique de l'atténuation du signal pour le calcul de l'ADC, mais cette méthode est coûteuse en temps d'acquisition et est approximative car elle suppose un voxel homogène et une atténuation monoexponentielle.

Le temps d'expérimentation nécessaire à l'acquisition des deux polarités est particulièrement gênant aux longs temps de diffusion où l'acquisition d'un spectre simple est déjà chronophage.

L'idée est donc de concevoir une séquence qui s'affranchit des termes croisés (au moins ceux avec les gradients d'imagerie) tout en ayant une bonne localisation.

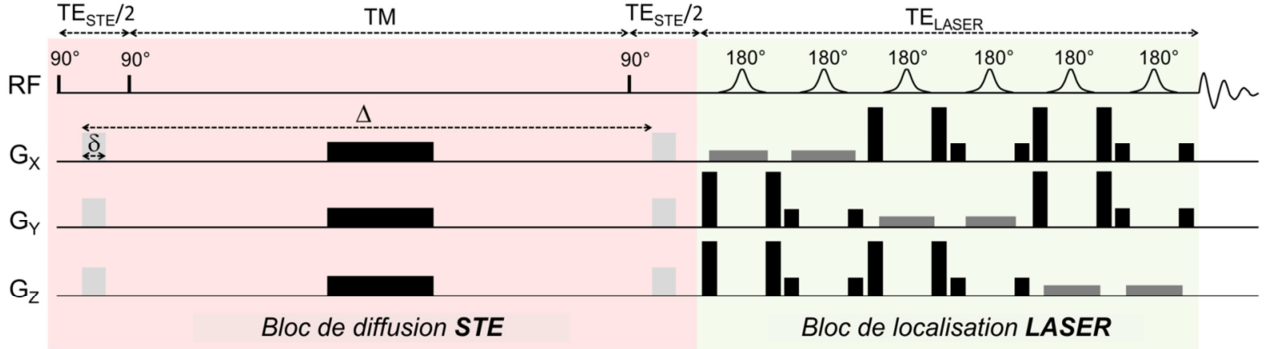
#### 6.2 La séquence STELASER

Nous avons introduit un écho stimulé, pondérable en diffusion, devant une séquence de localisation LASER (Localization by Adiabatic Selective Refocusing, cf §5.4). La séquence STELASER est représentée sur la Figure 5-1.

Les spins des protons sont d'abord excités par une impulsion créneau de très courte durée (0.1 ms). Pendant ce demi  $TE_{STE}$ , où l'aimantation est transversale, un gradient de diffusion de durée  $\delta$  est appliqué et déphase les spins relativement à leur position. Puis une autre impulsion créneau stocke cette aimantation dans le plan longitudinal. Pendant le temps de mélange TM, les métabolites diffusent. Puis l'aimantation est à nouveau basculée dans plan transversal et le même gradient de diffusion est appliqué : seuls les protons n'ayant pas bougé sont parfaitement à l'écho, les autres sont déphasés proportionnellement à la distance qu'ils ont parcouru (atténuation correspondante du signal, cf §4.1).



A la fin du temps d'écho de l'écho stimulé, le module LASER définit le voxel d'intérêt. En amont de l'excitation, un module VAPOR assure la suppression de l'eau (cf 5.4).



**Figure 6-1** : Chronogramme de la séquence STELASER, avec les gradients de diffusion (gris clair), les gradients de localisation (gris foncé) et les gradients de crusher (noir). Impulsion AFP pour la partie LASER, classique pour la partie STE. Comme dans l'étude de Shemesh et al. (2014) (sur l'amélioration des relaxations longitudinales des métabolites), l'impulsion AHP de la séquence LASER classique (Figure 3-2) est remplacée par un bloc inséré pour une mesure spécifique.

### 6.2.1 Absence de termes croisés

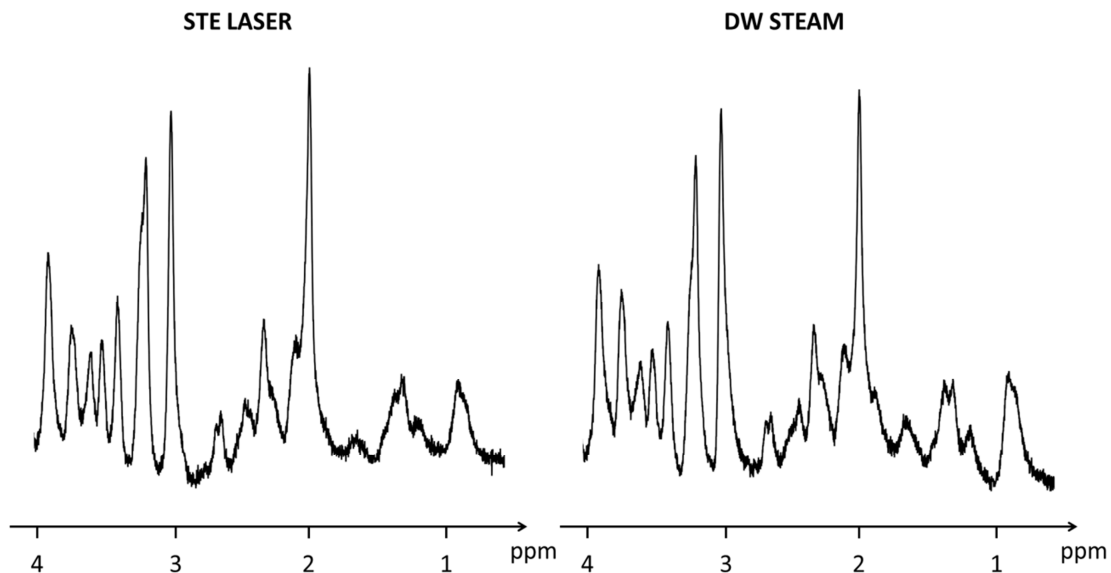
L'indépendance temporelle entre les temps d'écho de la partie diffusion ( $TE_{STE}$ ) et de la partie localisation ( $TE_{LASER}$ ) évite tout terme croisé entre les gradients d'imagerie et de diffusion. De plus, la séquence LASER permet une localisation très propre grâce aux trains de  $180^\circ$  adiabatiques et le déplacement chimique est minimisé grâce au  $B_{1max}$  suffisant de l'antenne cryogénique (§3.2). L'écho stimulé est pondéré par des gradients de diffusion qui servent également de spoilers aux impulsions  $90^\circ$ . Les gradients de la partie LASER contribuent légèrement à la pondération en diffusion ( $b_{LASER}=0.59 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ), mais cette contribution est totalement indépendante de la partie STE et est constante quelques soient l'intensité des gradients de diffusion et les combinaisons de TE/TM de la séquence. La pondération en diffusion associée à la séquence STELASER s'écrit donc :

$$b = \int_0^{TE} \mathbf{k}^2(t) dt = \int_0^{TE_{STE}} \mathbf{k}^2(t) dt + \int_{TE_{STE}}^{TE_{STE}+TE_{LASER}} \mathbf{k}^2(t) dt = b_{STE} + b_{LASER} \sim b_{STE}$$

$$b_{STE} = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left( \Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (6-1)$$

Le temps de diffusion est donc classiquement  $t_d = \Delta - \frac{\delta}{3}$ , comme pour la STEAM lorsque la contribution des gradients d'imagerie est négligée.

Les performances de la séquence sont comparables à celle de la STEAM en termes de signal à bruit (Figure 6-2).



**Figure 6-2 :** Comparaison des spectres obtenus avec la STEAM pondérée ( $TE/TM=15/60$  ms) et la STELASER ( $TE/TM=33.4/60$  ms ;  $TE_{STE}=8.4$  ms,  $TE_{LASER}=25$  ms). Le temps d'écho est plus court avec la STEAM, ce qui est notable sur la contribution des macromolécules au spectre.

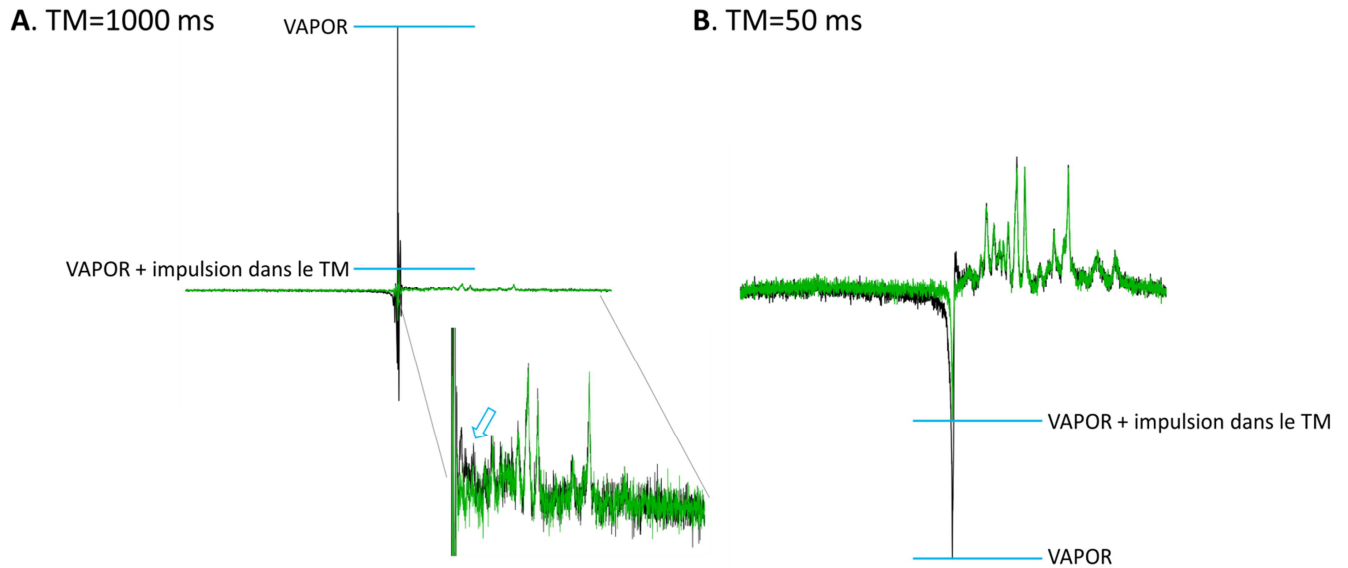
### 6.2.2 Optimisation de la suppression de l'eau

La suppression de l'eau est principalement réalisée par un module VAPOR (4.2) placé en amont de la séquence.

Les temps de relaxation longitudinale de l'eau dans le cerveau sont compris entre  $\sim 1500$  ms et  $\sim 2300$  ms à 11.7 T (de Graaf et al., 2006). Lorsque le délai entre la fin du module VAPOR et l'acquisition de la FID est court (typiquement pour des TM courts), l'aimantation saturée des protons de l'eau n'a pas le temps de relaxer et cette dernière ne contamine pas les spectres.

Cependant, lorsque les temps de diffusion étudiés sont plus longs, une petite partie des spins des protons de l'eau peuvent relaxer. Considérant la quantité d'eau dans le cerveau, cette infime partie qui relaxe dégrade fortement la qualité de la suppression de l'eau et donc des spectres associés. Pour parer ce problème, nous avons ajouté une impulsion de suppression de l'eau à la fin du temps de mélange : l'eau est à nouveau déphasée peu de temps avant l'acquisition et sa suppression améliorée (Figure 6-3). Cet

ajout a été réalisé après l'obtention des résultats présentés dans cette partie, donc concerne essentiellement les résultats de la Partie 3.



**Figure 6-3** : Spectres acquis sans pondération en diffusion avec la STELASER dans un voxel de 72  $\mu\text{l}$ , à TM=1000 ms (A) et à TM=50 ms (B) avec impulsion de suppression de l'eau à la fin du TM (vert) ou sans (noir). Les lignes et la flèche bleues désignent l'amélioration apportée par l'impulsion de saturation supplémentaire sur l'eau dans le TM. Chaque spectre représente la moyenne du signal sur 8 répétitions. Optimisation valable pour la partie 3.

### 6.3 Les très hautes valeurs de pondération en diffusion

L'intérêt d'étudier l'atténuation du signal avec l'augmentation de la pondération en diffusion ou des gradients de diffusion est en partie décrit en §4.3.

Lorsque les gradients sont intenses, un petit déplacement induit une grande différence de phase  $\Delta\Phi = \gamma\mathbf{G} \cdot (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)$ . L'atténuation reste monoexponentielle aux faibles valeurs de  $b$  et dépend du coefficient de diffusion intracellulaire ( $D_{\text{intra}}$ ) et de la restriction. En augmentant  $b$ , la finesse du maillage spatial imposée par les gradients augmente, si bien que la sensibilité à la restriction augmente et l'atténuation n'est plus monoexponentielle (Figure 4-2).

Choisir un temps de diffusion correspondant à une distance de diffusion de l'ordre du micron permet typiquement d'être sensible au diamètre des fibres. Si le temps de diffusion est trop long par rapport à

l'échelle de restriction d'intérêt, le bruit de mesure risque d'être plus important que la variation induite par différents diamètres des fibres sur l'atténuation du signal.

L'obtention d'informations sur la microstructure est l'objectif générique des études de ce manuscrit et la détermination du rayon des fibres et le  $D_{\text{intra}}$  est l'un des objectifs de cette étude. Nous avons voulu profiter de la reproductibilité et la qualité des acquisitions produites par la STELASER aux hautes valeurs de  $b$  pour vérifier que l'environnement géométrique d'une molécule est le principal facteur déterminant l'atténuation du signal en spectroscopie de diffusion.

### **6.3.1 Une dépendance à la relaxation ?**

L'anisotropie de la diffusion de l'eau dans le cerveau reflète, entre autres, l'orientation des fibres de matière blanche et permet d'étudier la connectivité grâce à la tractographie. La diffusion de l'eau est plus récemment régulièrement associée à la recherche de caractéristiques à petites échelles spatiales telles que le diamètre des axones ou les rapports surface sur volume des cellules : son potentiel pour examiner la microstructure d'un environnement n'est plus à établir (Beaulieu, 2002 ; Nilsson et al., 2013 ; Shemesh et al., 2010).

La diffusion des métabolites, caractérisée par son intracellularité, peut également être un moyen de sonder de façon plus spécifique la microstructure du cerveau, comme nous l'avons décrit précédemment et comme d'autres études l'ont exploitée. L'hypothèse est alors qu'à un temps de diffusion donné, l'atténuation du signal dépend principalement des caractéristiques géométriques de l'environnement.

#### *Différents compartiments/différentes relaxations*

Si le métabolite est réparti dans plusieurs compartiments (cytosol, mitochondries, organelles) avec des propriétés de relaxation différentes, ces dernières peuvent avoir un impact sur l'atténuation du signal. En d'autres mots, l'influence de la géométrie des compartiments sur l'atténuation du signal peut alors être fortement pondérée par la relaxation des différents compartiments, selon les paramètres de la séquence (TE, TM, TR). Par exemple à un TE donné, l'atténuation du signal pourrait traduire principalement les propriétés géométriques d'un organelle et pas de la fibre dans laquelle diffuse principalement le métabolite (illustration Figure 6-4).

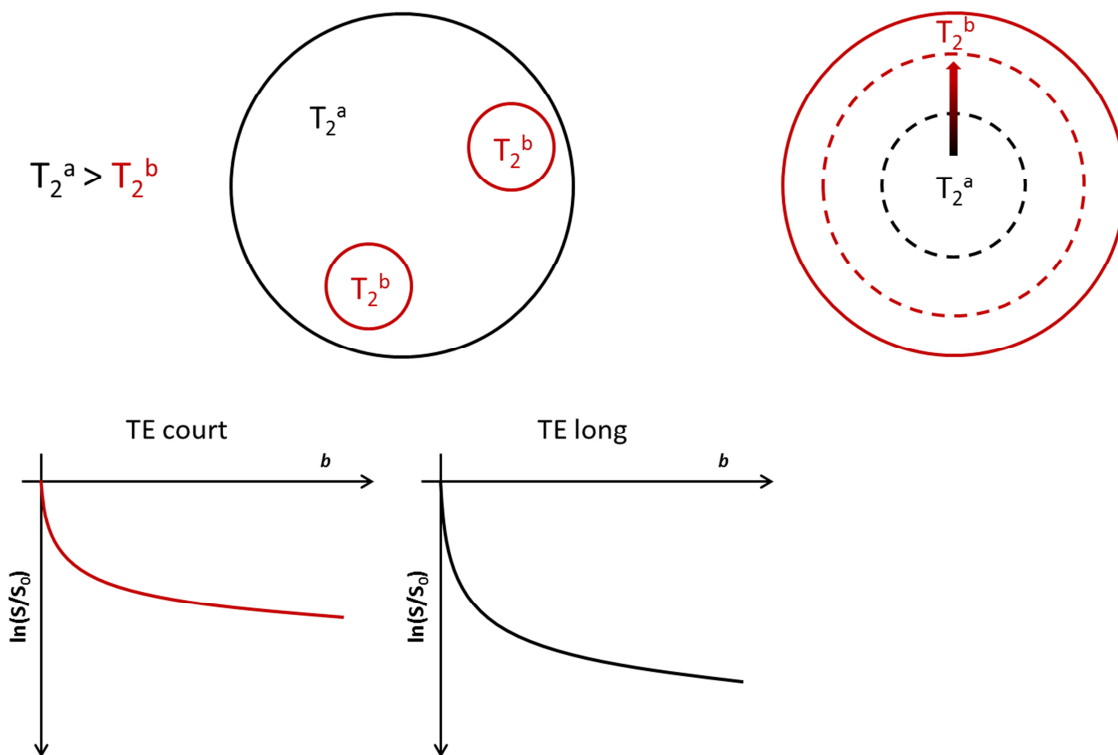
Si le métabolite appartient à un compartiment unique où ses propriétés de relaxation sont homogènes, sa diffusion peut fidèlement rendre compte des propriétés géométriques de son environnement. Cependant, la relaxation pourrait être variable sur une région proche de la membrane (le métabolite entre en collision

avec la membrane cellulaire et cela peut changer sa relaxation) et cela induirait un nouveau biais dans l'estimation de la structure principale de la cellule.

Quelques travaux ont rapporté que l'influence de la relaxation sur l'atténuation du signal dans une expérience de spectroscopie diffusion peut être significative (Assaf et al., 1998 ; Assaf et al., 1999 ; Branzoli et al., 2014) et cela a également été rapporté pour l'eau, présente dans tous les compartiments possibles.

### A. Deux compartiments distincts

### B. Un compartiment avec un $\Delta T_2$

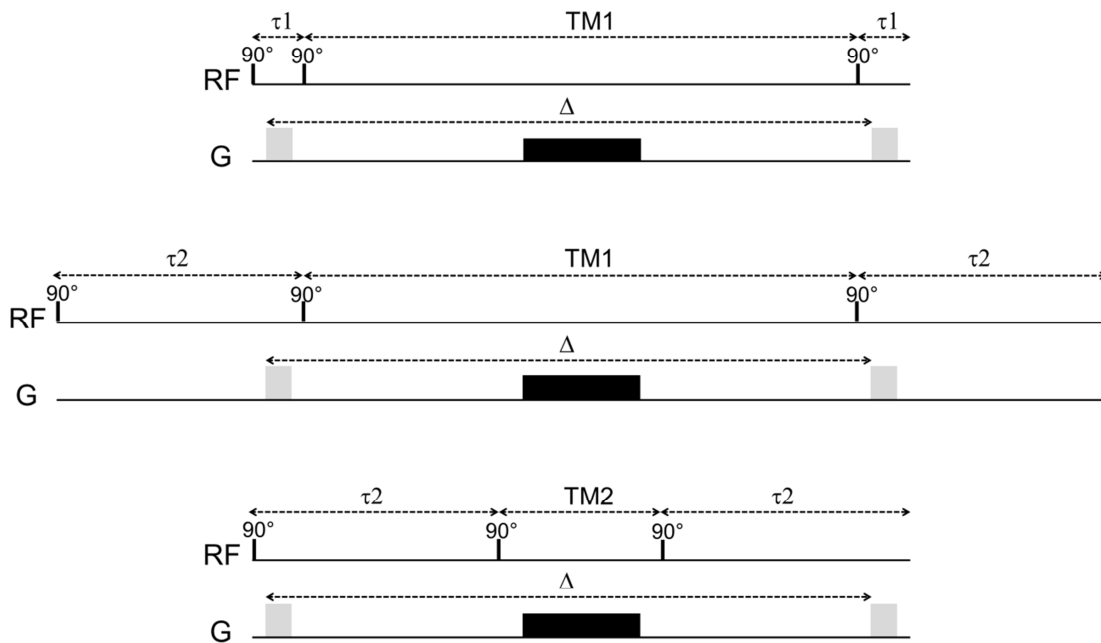


**Figure 6-4** (A) Des molécules diffusent dans des compartiments leur donnant des propriétés de relaxation différentes. Exemple d'un temps de relaxation transversal  $T_2^b$  plus court dans un compartiment de petite taille (rouge) par rapport au compartiment principal de relaxation  $T_2^a$  (noir). L'atténuation du signal avec une séquence à TE court est sensible au compartiment de temps de relaxation plus court (rouge),  $T_2^b$ , par rapport à une acquisition à TE plus long où l'atténuation du signal est plutôt représentative de la diffusion des molécules dans le compartiment principal (noir). (B) Exemple d'un compartiment unique dont les molécules diffusant à l'intérieur ont des temps de relaxation transversale variables selon leur proximité à la membrane.

Nous avons donc voulu tirer parti de la très bonne qualité des mesures à hautes valeurs de  $b$  ainsi que de la flexibilité de TE et de TM qu'offre l'écho stimulé de la séquence STELASER pour quantifier l'importance des propriétés de relaxation par rapport aux propriétés de diffusion.

### 6.3.2 Méthodes spécifiques

L'étude est réalisée dans un gros voxel de  $72 \mu\text{l}$  placé dans le cerveau de la souris (encart Figure 6-8) pour avoir le meilleur signal à bruit possible. La STELASER offre la possibilité d'avoir des gradients de diffusion assez « longs » ( $\delta = 3 \text{ ms}$ ) en conservant un temps d'écho assez court ( $33.4 \text{ ms}$ ), si bien qu'elle permet d'atteindre des pondérations en diffusion record in vivo ( $60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) sur les 6 métabolites principaux.  $\delta = 3 \text{ ms} \ll \Delta = 60 \text{ ms}$ , l'approximation des gradients courts reste valable.



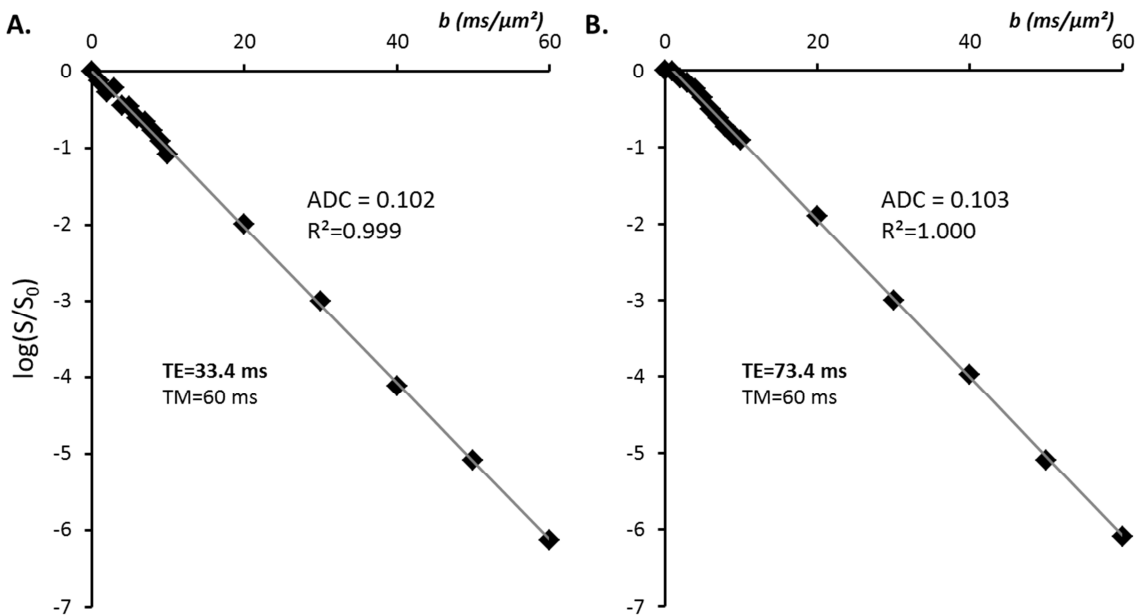
**Figure 6-5** : La séquence STELASER permet de varier le temps d'écho et le temps de mélange, indépendamment du temps de diffusion  $\Delta - \delta/3$ . Les gradients de diffusion de durée  $\delta$  sont en gris, le crusher en noir.  $\tau = TE_{STE}/2$  (seul le module STE est représenté par souci de clarté).

A un temps de diffusion fixé, trois combinaisons de TE/TM sont possibles (Figure 6-5) selon la façon dont les gradients de diffusion sont placés dans les demis temps d'écho. L'étude a été menée à deux temps de diffusion :  $63.2 \text{ ms}$  et  $253.2 \text{ ms}$ . Pour chaque combinaison, la pondération maximale est imposée par la nécessité d'avoir un signal à bruit suffisant sur une répétition pour pouvoir rephaser individuellement, c'est-à-dire un SNR d'environ 5 avec un  $lb=3$  sur le NAA. C'est ainsi que nous avons optimisé le TE de

33.4 ms et le TM de 60 ms : nous pouvons atteindre une pondération en diffusion  $60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec un TE le plus court possible et un TM qui permet encore d'être sensible à une échelle de restriction de l'ordre du diamètre des fibres. Le temps d'écho le plus long (73.4 ms) ne permet pas le rephasage individuel jusqu'à  $b_{\text{max}}(\text{TE}=33.4 \text{ ms})=60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , la pondération maximale acceptable (selon les critères définis ci-dessus) est  $b_{\text{max}}(\text{TE}=73.4 \text{ ms})=30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .

La séquence a été validée sur un fantôme d'éthylène glycol (Figure 6-6), dont la viscosité est élevée, ce qui permet d'avoir un signal quantifiable jusqu'à  $b=60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . La base de macromolécules, le post-processing et le traitement final des spectres sont décrits dans le chapitre 5.

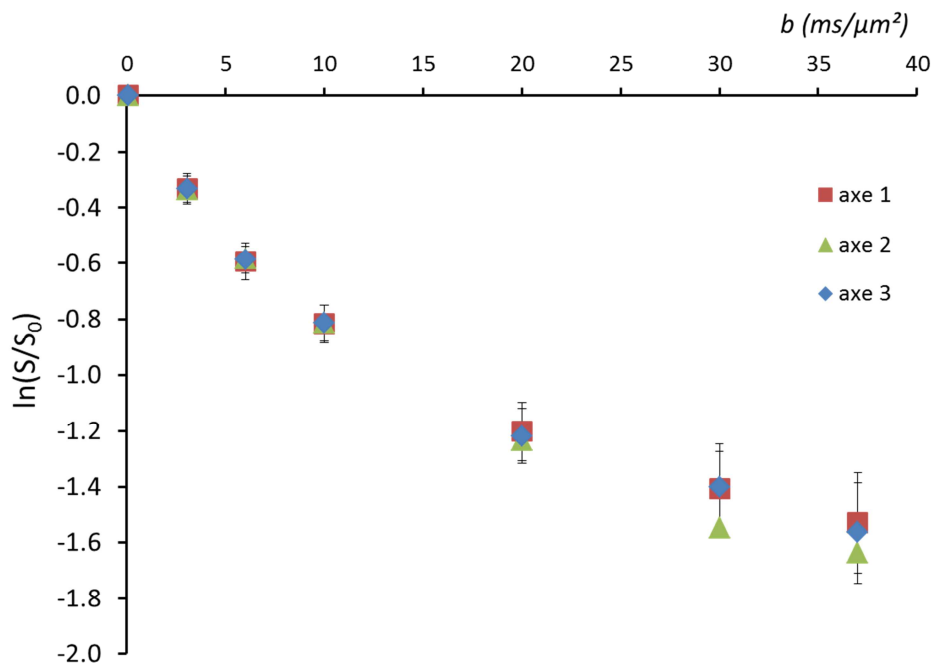
Pour chaque condition (six au total), l'expérience a été répétée 4 fois. Pour effectuer ces expériences, 10 souris mâles C57/B16 ont été scannées.



**Figure 6-6** : Atténuation du signal jusqu'à  $b=60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la STELASER dans un fantôme d'éthylène glycol, pour  $\text{TE}=33.4 \text{ ms}$  et  $\text{TE}=73.4 \text{ ms}$ . L'atténuation est bien monoexponentielle.

Enfin, nous avons vérifié l'isotropie supposée du grand voxel que nous utilisons pour nos mesures. Pour cela, nous avons mesuré l'atténuation du signal selon trois axes orthogonaux  $(-0.5 \ 1 \ 1)$ ,  $(1 \ -0.5 \ 1)$  et  $(1 \ 1 \ -0.5)$  (Figure 6-7). L'atténuation du signal à  $\text{TM}=50 \text{ ms}$  est effectivement sensiblement la même selon les trois axes pour l'ensemble des métabolites.

Nous pouvons ainsi appliquer les gradients de diffusion sur les trois axes simultanément (vecteur  $\mathbf{G}_{\text{diff}} [1 \ 1 \ 1]$ ) et maximiser la pondération en diffusion selon cette direction.



**Figure 6-7 :** Atténuation du signal mesurée selon trois axes orthogonaux pour la moyenne des 6 métabolites principaux (NAA, Glu, tCr, Tau, tCho et Ins) mesurée dans un voxel de 56  $\mu\text{l}$  centré autour du striatum d'une souris (placé comme sur la Figure 9-4-A). Acquisition avec STELASER (TE/TM/TR=33.4/50/2000 ms).

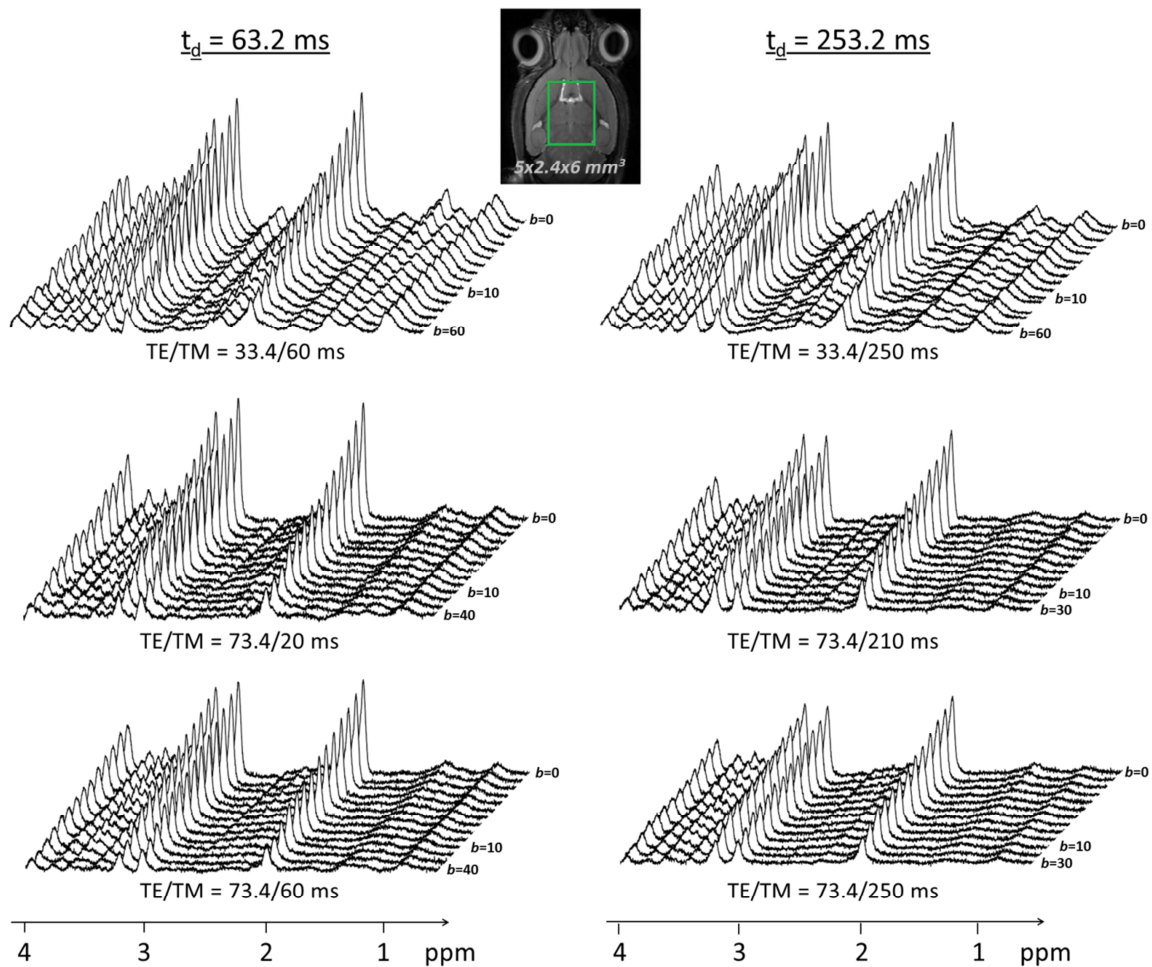
### 6.3.3 Données brutes

Un échantillon de spectres représentatifs de chaque combinaison est présenté sur la Figure 6-8. Les SNR des spectres par rapport au NAA sont compris entre 27 pour la combinaison de TE/TM la plus défavorable (73/250) à  $b=30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et 105 pour TE/TM=33/60 ms à  $b=0.05 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .

Pour comparer les atténuations du signal au-delà de toute modélisation, une analyse de variance à deux facteurs (TE et TM) suivie d'un test HSD de Turkey a été effectuée sur l'atténuation du signal pour l'ensemble des valeurs de  $b$  à chaque temps de diffusion.

L'atténuation du signal de l'eau et des métabolites n'est clairement pas mono-exponentielle : l'effet de la restriction est visible aux hautes valeurs de  $b$ . L'atténuation du signal des macromolécules est beaucoup plus bruitée. Le  $T_2$  très court des macromolécules induit une perte de signal importante entre TE=33.4 et 73.4 ms et l'atténuation est d'autant plus bruitée. Cependant elle semble plus mono-exponentielle que celle des métabolites.



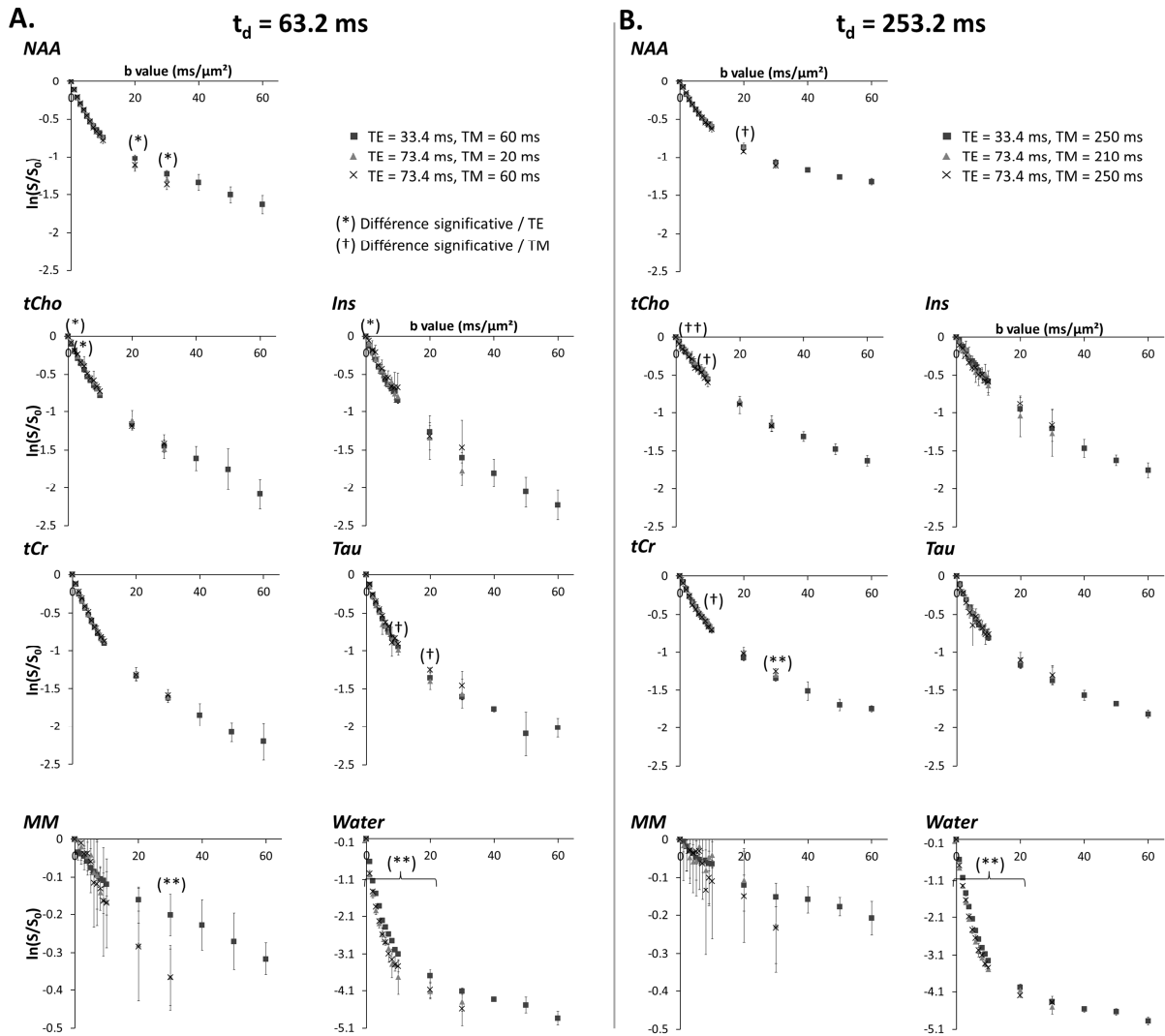


**Figure 6-8** : Echantillon de spectres représentatifs de chaque condition de TE/TM. Encart : Image pondérée en  $T_2$  du cerveau d'une des souris scannées et placement du voxel de  $72 \mu\text{l}$ .

L'impact de la variation de TE et TM est globalement très faible sur l'atténuation du signal, quasiment pour tous les métabolites (Figure 6-9). Il pourrait y avoir une petite dépendance au TE pour le NAA, car deux points consécutifs ( $b=20$  et  $b=30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) sont significativement différents aux deux temps d'écho étudiés. L'eau est présente dans tous les compartiments, son atténuation du signal varie donc très significativement avec le temps d'écho. Les macromolécules exhibent également des différences significatives à  $\text{TM}=60 \text{ ms}$  ( $b=30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ), mais l'amplitude des barres d'erreur nous empêche de conclure fermement quant à leur dépendance au temps d'écho.

La dépendance au TM est très ponctuelle ou quasiment inexistante, mais l'échelle de variation du TM est aussi probablement trop petite pour que l'on détecte une différence : face à des métabolites présentant des  $T_1$  de l'ordre de  $1500 \text{ ms}$ , les  $40 \text{ ms}$  de variation de TM que l'on propose de regarder sont négligeables.

Cependant les  $T_2$  des métabolites varient entre 100 ms et 300 ms, donc une variation de 40 ms est non négligeable sur cette durée de relaxation.



**Figure 6-9 :** Atténuation du signal à  $t_d=63.2$  ms (A) et  $t_d=253.2$  ms (B) pour les 6 métabolites principaux, les macromolécules et l'eau. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Valeur statistique relative au TE : (\*) p-value < 0.05 (\*\*) p-value < 0.01 (\*\*\*) p-value < 0.001. Valeur statistique relative au TM : (†) p-value < 0.05 (††) p-value < 0.01 (†††) p-value < 0.001.

### 6.3.4 Données dans leur ensemble : ajustement bi-exponentiel et ADC

Bien que les différences point-à-point ne soient pas très significatives, il est important de vérifier que les données prises dans leur ensemble n'expriment pas de différences relatives aux variations de TE et TM.

Pour ne pas dépendre de modèle géométrique, comme les cylindres infinis par exemple (cf §8.1), l'ajustement bi-exponentiel est bon moyen d'appréhender les données et est régulièrement utilisé dans la littérature. Il est décrite par les paramètres  $ADC_{fast}$ ,  $ADC_{slow}$  et  $f_{slow}$  par la simple équation suivante :

$$\frac{S}{S_0} = (1 - f_{slow}) \exp(-b \cdot ADC_{fast}) + f_{slow} \exp(-b \cdot ADC_{slow}) \quad (6-2)$$

Les points à très haute pondération en diffusion ( $b=40$  à  $60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) stabilisent beaucoup l'ajustement bi-exponentiel et ont une influence notable sur l'évaluation de la fraction lente. Pour pouvoir comparer tous les jeux de données entre eux ( $b_{max}=30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  dans les pires conditions), l'ajustement bi-exponentiel est effectué entre  $b=0$  et  $30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour toutes les conditions.

Nous avons également extrait l'ADC en effectuant une régression linéaire sur l'atténuation du signal des différents métabolites entre  $b=0$  et  $b=5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ( $R^2>0.99$  pour presque tous les métabolites) afin d'avoir une information sur la potentielle variabilité d'un paramètre plus classique.

L'ajustement est réalisé pour chaque jeu de données et les déviations standard de la Table 6-1 sont donc issues des différences interindividuelles, et pas d'une approche de Monte Carlo comme dans l'étude de Pfeuffer et al. (2000), ce qui souligne la qualité de nos données.

Les paramètres estimés pour les métabolites confirment la tendance observée sur les données brutes et ne dépendent pas significativement du TE ou du TM de la séquence. L'ADC de l'eau, comme attendu (multi-compartmentalité), varie très significativement en fonction du TE. A  $TE=33 \text{ ms}$ , la mesure de l'ADC de l'eau est probablement encore sensible à une population d'eau de  $T_2$  court, présente dans la myéline par exemple : l'eau y diffuse beaucoup plus lentement car la diffusion y est beaucoup plus encombrée. En augmentant le TE, il n'est donc pas surprenant d'observer une augmentation de l'ADC, étant de moins en moins sensible à ces compartiments à  $T_2$  courts.

**Table 6-1** : Résultat de l'ajustement monoexponentiel (entre  $b=0$  et  $b=5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) pour l'obtention de l'ADC et de l'ajustement bi-exponentiel pour l'obtention des composantes lentes et rapides de l'atténuation du signal ( $\text{ADC}_{\text{fast}}$ ,  $\text{ADC}_{\text{slow}}$  et la fraction lente) aux deux temps de diffusion étudiés ( $t_d=63.2 \text{ ms}$  et  $t_d=253.2 \text{ ms}$ ) pour les 6 métabolites principaux, les macromolécules et l'eau. Valeur statistique relative au TE : (\*) p-value < 0.05 (\*\*) p-value < 0.01 (\*\*\*) p-value < 0.001. Valeur statistique relative au TM : (†) p-value < 0.05 (††) p-value < 0.01 (†††) p-value < 0.001.

	<b><math>t_d = 63.2 \text{ (ms)}</math></b>		<u>Ajustement</u>	<u>Ajustement</u>		
	<b>TE</b>	<b>TM</b>	<u>mono-exponentiel</u>	<u>bi-exponentiel</u>		
			ADC	$\text{ADC}_{\text{fast}}$	$\text{ADC}_{\text{slow}}$	$f_{\text{slow}}$
NAA	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.097 \pm 0.004$	$0.220 \pm 0.023$	$0.019 \pm 0.002$	$0.510 \pm 0.032$
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.095 \pm 0.004$	$0.181 \pm 0.034$	$0.016 \pm 0.010$	$0.439 \pm 0.108$
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.094 \pm 0.008$	$0.196 \pm 0.029$	$0.021 \pm 0.008$	$0.480 \pm 0.105$
tCr	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.109 \pm 0.005$	$0.191 \pm 0.033$	$0.023 \pm 0.005$	$0.400 \pm 0.088$
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.106 \pm 0.005$	$0.204 \pm 0.056$	$0.025 \pm 0.009$	$0.430 \pm 0.127$
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.101 \pm 0.010$	$0.176 \pm 0.041$	$0.019 \pm 0.013$	$0.364 \pm 0.124$
tCho	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.091 \pm 0.009$	$0.176 \pm 0.011$	$0.024 \pm 0.005$	$0.479 \pm 0.063$
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.078 \pm 0.008$	$0.184 \pm 0.056$	$0.027 \pm 0.009$	$0.524 \pm 0.180$
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.082 \pm 0.007$	$0.131 \pm 0.035$	$0.012 \pm 0.014$	$0.335 \pm 0.135$
Ins	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.098 \pm 0.007$	$0.198 \pm 0.034$	$0.029 \pm 0.009$	$0.494 \pm 0.119$
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.094 \pm 0.005$	$0.283 \pm 0.151$	$0.036 \pm 0.025$	$0.588 \pm 0.313$
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.086 \pm 0.028$	$0.121 \pm 0.006$	$0.010 \pm 0.017$	$0.300 \pm 0.154$
Tau	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.118 \pm 0.002$	$0.210 \pm 0.033$	$0.022 \pm 0.004$	$0.387 \pm 0.063$
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.128 \pm 0.016$	$0.220 \pm 0.030$	$0.020 \pm 0.016$	$0.384 \pm 0.121$
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.112 \pm 0.008$	$0.199 \pm 0.033$	$0.014 \pm 0.013$	$0.365 \pm 0.091$
MM	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.016 \pm 0.005$	$0.861 \pm 1.439$	$0.003 \pm 0.003$	$0.893 \pm 0.044$
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.011 \pm 0.014$	$0.075 \pm 0.071$	$0.010 \pm 0.005$	$0.904 \pm 0.053$
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.011 \pm 0.007$	$0.053 \pm 0.055$	$0.008 \pm 0.006$	$0.876 \pm 0.153$
Eau	<b>33.4</b>	<b>60</b>	$0.491 \pm 0.029$ (***)	$0.649 \pm 0.120$	$0.069 \pm 0.028$	$0.090 \pm 0.027$ (*)
	<b>73.4</b>	<b>60</b>	$0.575 \pm 0.010$ (***)	$0.714 \pm 0.113$	$0.048 \pm 0.016$	$0.051 \pm 0.021$ (*)
	<b>73.4</b>	<b>20</b>	$0.568 \pm 0.023$ (***)	$0.735 \pm 0.078$	$0.061 \pm 0.017$	$0.061 \pm 0.011$ (*)

	$t_d = 253.2$ (ms)		<u>Ajustement</u> <u>mono-exponentiel</u>	<u>Ajustement</u> <u>bi-exponentiel</u>		
	TE	TM	ADC	ADC <sub>fast</sub>	ADC <sub>slow</sub>	f <sub>slow</sub>
NAA	33.4	250	$0.077 \pm 0.003$	$0.202 \pm 0.027$	$0.018 \pm 0.002$	$0.587 \pm 0.035$
	73.4	210	$0.073 \pm 0.004$	$0.202 \pm 0.045$	$0.019 \pm 0.005$	$0.608 \pm 0.087$
	73.4	250	$0.076 \pm 0.006$	$0.164 \pm 0.019$	$0.016 \pm 0.002$	$0.522 \pm 0.020$
tCr	33.4	250	$0.083 \pm 0.012$	$0.172 \pm 0.044$	$0.022 \pm 0.005$	$0.496 \pm 0.075$
	73.4	210	$0.081 \pm 0.007$	$0.213 \pm 0.028$	$0.027 \pm 0.004$	$0.626 \pm 0.071$
	73.4	250	$0.089 \pm 0.001$	$0.191 \pm 0.029$	$0.020 \pm 0.004$	$0.514 \pm 0.059$
tCho	33.4	250	$0.063 \pm 0.003$	$0.171 \pm 0.046$	$0.025 \pm 0.008$	$0.661 \pm 0.12$
	73.4	210	$0.057 \pm 0.011$	$0.168 \pm 0.059$	$0.025 \pm 0.008$	$0.698 \pm 0.132$
	73.4	250	$0.062 \pm 0.014$	$0.154 \pm 0.067$	$0.017 \pm 0.013$	$0.529 \pm 0.218$
Ins	33.4	250	$0.063 \pm 0.012$	$0.125 \pm 0.051$	$0.013 \pm 0.015$	$0.430 \pm 0.202$
	73.4	210	$0.066 \pm 0.018$	$0.111 \pm 0.047$	$0.009 \pm 0.009$	$0.343 \pm 0.162$
	73.4	250	$0.081 \pm 0.006$	$0.385 \pm 0.333$	$0.024 \pm 0.014$	$0.667 \pm 0.168$
Tau	33.4	250	$0.101 \pm 0.003$	$0.190 \pm 0.030$	$0.018 \pm 0.009$	$0.431 \pm 0.094$
	73.4	210	$0.097 \pm 0.005$	$0.222 \pm 0.065$	$0.019 \pm 0.014$	$0.493 \pm 0.150$
	73.4	250	$0.122 \pm 0.026$	$0.302 \pm 0.068$	$0.025 \pm 0.004$	$0.559 \pm 0.035$
MM	33.4	250	$0.009 \pm 0.003$	$0.291 \pm 0.308$	$0.003 \pm 0.002$	$0.896 \pm 0.118$
	73.4	210	$0.012 \pm 0.008$	$0.065 \pm 0.117$	$0.006 \pm 0.003$	$0.967 \pm 0.035$
	73.4	250	$0.013 \pm 0.014$	$0.122 \pm 0.097$	$0.003 \pm 0.003$	$0.889 \pm 0.136$
Eau	33.4	250	$0.453 \pm 0.010$ (****)	$0.523 \pm 0.019$ (****)(†)	$0.053 \pm 0.006$	$0.059 \pm 0.004$
	73.4	210	$0.529 \pm 0.005$ (****)	$0.637 \pm 0.019$ (****)(†)	$0.054 \pm 0.008$	$0.055 \pm 0.007$
	73.4	250	$0.520 \pm 0.012$ (****)	$0.603 \pm 0.020$ (****)(†)	$0.051 \pm 0.005$	$0.51 \quad 0.004$

### 6.3.5 Discussion et conclusion

Les ADC des métabolites rapportés ici sont plutôt dans la tranche basse de la littérature. Les ADC des métabolites mesurés à des temps de diffusion équivalents sont compris entre 0.1 et 0.15  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ , dans les études avec rephasage individuel et MM expérimentales incluses dans la base LCMoDel (Najac et al., 2014&2016 ; Pfeuffer et al., 2000 ; Valette et al., 2005 ; Kan et al., 2012). La différence est en partie liée au fait que nous avons mesuré l'ADC par un ajustement log linéaire entre  $b=0$  et 5  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ , alors qu'en général les valeurs maximales de pondération en diffusion utilisées pour le calcul de l'ADC sont plus basses ( $\leq 3 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ).

L'atténuation du signal des métabolites s'accorde plutôt bien avec l'ajustement bi-exponentiel et la fraction lente  $f_{\text{slow}}$  est autour de 50% pour tous les métabolites. Cette fraction est beaucoup plus faible pour l'eau. L'eau a une composante extracellulaire beaucoup plus importante et comme le placement du voxel entoure les ventricules, cette eau extracellulaire est en partie beaucoup plus libre dans notre étude.

L'ADC des macromolécules est compris entre 0.009 et 0.016  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  selon les conditions. Dans l'étude de Pfeuffer et al. (2000), l'ADC des macromolécules est extrait par un ajustement monoexponentiel entre  $b=0$  et 49  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ ,  $\text{ADC}_{\text{MM, Pfeuffer}}=0.0063 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ . En effet, considérant la faible diffusivité des macromolécules, liée à leur gros poids moléculaire (Behar et Ogino, 1993), il peut être justifié de considérer qu'elles ne diffusent pas sur d'assez grandes distances pour expérimenter la restriction. Nos résultats suggèrent une légère déviation du comportement monoexponentiel, notamment à temps d'écho court. Lorsque nous réalisons un ajustement log linéaire entre  $b=0$  et 50  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  à  $\text{TE}=33.4 \text{ ms}$  et  $\text{TM}=60 \text{ ms}$  (meilleures conditions de signal à bruit), l'ADC est évalué à 0.005  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ , valeur assez proche de celle déterminée par Pfeuffer et al (2000).

Concernant la dépendance de l'atténuation du signal aux propriétés de relaxation, nous n'observons pas d'influence de la variation du temps d'écho, assez notable par rapport au temps de relaxation transversal moyen des métabolites, et du temps de mélange, assez faible par rapport au temps de relaxation longitudinal moyen des métabolites. Même si cette étude est la première, à notre connaissance, à s'intéresser à l'impact du  $T_1$  sur les propriétés de diffusion, un  $\Delta\text{TM}$  plus important permettrait de conclure plus fermement. Seule l'atténuation du signal du NAA exhibe une différence légère, mais significative entre  $\text{TE}=33.4 \text{ ms}$  et  $\text{TE}=73.4 \text{ ms}$ . Il est possible qu'une partie du NAA diffuse plus lentement ou de façon plus restreinte dans des compartiments qui raccourcissent son  $T_2$ . A TE court, la sensibilité y serait accrue. Cette hypothèse est développée dans le chapitre 8, avec la modélisation des données. Les macromolécules semblent aussi présenter une dépendance au temps d'écho. Dans la mesure où les macromolécules représentent principalement les résonances des acides aminés contenus dans l'ensemble des protéines du cerveau, les molécules auxquelles ils appartiennent sont de poids moléculaires très variés et forment un continuum (Behar et Ogino, 1993). Les  $T_2$  des protons contenus dans ces molécules sont probablement variables selon la taille de la protéine associée, d'où la dépendance au TE observée.

Plusieurs travaux ont rapporté une contribution de la relaxation  $T_2$  sur l'atténuation du signal due à la diffusion. Ceux de Assaf et Cohen (1998&1999) reportent une forte influence du TE sur l'atténuation du signal de tCho, tCr et NAA dans le nerf optique bovin (excisé) ou juste du NAA dans le cerveau rat (extrait). Une troisième étude (Branzoli et al., 2014) mesure une dépendance entre le TE et les propriétés de diffusion du NAA et de la tCr dans la matière blanche humaine.

Les différences entre ces études et celle présentée dans ce manuscrit peuvent tenir à plusieurs facteurs :

- Les régions explorées pour les investigations sur le nerf optique et la matière blanche sont très spécifiques et myélinisées, ce qui leur donne naturellement une variabilité de  $T_2$  plus importante ( $T_2$  des molécules en général plus court dans la myéline). Le voxel utilisé dans notre étude contient tout type de tissu (avec une majorité de matière grise). Il est possible que ce manque de spécificité moyenne les différences qu'il aurait pu être possible d'observer dans des plus petites régions d'intérêt du cerveau de la souris. Dans l'étude d'Assaf&Cohen (1998), la séquence ne localise pas le signal, tout le signal du cerveau (extrait) est donc reçu. Selon la position du cerveau dans le spectromètre (placé « au hasard »), la contribution du cervelet, riche en myéline, peut être importante aussi.
- Les intervalles de TE explorés sont différents : dans les autres études, l'intervalle de TE considéré est environ deux fois plus grand. En augmentant davantage le temps d'écho, nous aurions peut-être vu une dépendance plus nette de l'atténuation du signal du NAA à ce dernier. Néanmoins, nous ne pouvions pas augmenter davantage le TE si nous voulions garder la possibilité d'avoir assez de signal sur chaque spectre pour rephaser individuellement. Cette contrainte est particulièrement importante dans le cadre d'études à hautes pondérations en diffusion (Figure 5-2). De plus, l'intervalle de TE étudié est suffisant pour que de potentielles populations de métabolites à  $T_2$  très court (de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes, comme suggérées par Assaf&Cohen), changent l'atténuation du signal entre TE=33 ms et TE=73 ms, face à des populations de métabolites de  $T_2$  plus longs. Cependant, si des populations de métabolites de  $T_2$  différents et très longs (quelques centaines de millisecondes, comme identifiés par Assaf&Cohen dans le nerf optique excisé, à TE=550 ms), nous ne serions en effet pas en mesure de détecter leur impact sur l'atténuation du signal entre TE=33 ms et TE=73 ms.
- Concernant les études de Assaf&Cohen, il est possible que les spectres n'aient pas été rephasés individuellement, ce qui pourrait expliquer une plus grande atténuation du signal à long TE. De plus dans l'étude de 1998, les cerveaux sont frais et simplement rincés avec une solution saline deutérée. L'ADC du NAA rapporté est faible. Les ADC de tous les métabolites baissent de façon générale en post-mortem (Wick et al., 1995). Mais il chute aussi de manière importante entre des temps de diffusion compris entre 35 ms et 305 ms (de 0.09 à 0.04  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ), ce indique peut être une dégradation du tissu post-mortem (cf §6.4, où l'ADC du NAA est plutôt stable avec l'augmentation du temps de diffusion) : le NAA pourrait se trouver dans plus de compartiments qu'*in vivo*, y compris à l'extérieur des cellules.
- Les macromolécules ont un rôle fondamental dans l'estimation de la diffusion des métabolites, surtout à temps d'écho court. Si elles ne sont pas correctement quantifiées, cela peut induire un

fort biais pour la mesure des ADC. Les articles d'Assaf&Cohen (1998&1999) ne mentionnent pas les macromolécules et quantifient les métabolites en mesurant la hauteur du pic. L'étude de Branzoli et al. (2014) intègre les macromolécules dans la base LCMModel, mais conserve la base simulée proposée par LCMModel. La contribution des macromolécules au spectre peut donc être variable en fonction de la pondération en diffusion, du temps de mélange ou du temps d'écho selon la façon dont LCMModel a réalisé son meilleur fit. Cette différence méthodologique majeure pourrait être à l'origine de la divergence entre nos résultats.

Au-delà des différences constatées avec des études précédentes, notre étude nous permet de conclure que dans l'intervalle de temps d'écho étudié (33-73 ms), il n'existe pas de dépendance de l'atténuation du signal à la relaxation, sauf éventuellement pour le NAA. La diffusion des métabolites étudiée dans ces conditions d'acquisition résulte donc principalement de la géométrie de leur environnement et l'influence des propriétés de relaxation est négligeable. Pour extraire les paramètres géométriques de ces courbes de diffusion ( $D_{\text{intra}}$  et diamètre des fibres), un modèle de cylindres infinis orientés isotropiquement a été utilisé, légèrement modifié pour s'ajuster au NAA (chapitre 8).

#### **6.4 Une autre application de la STELASER: les temps de diffusion très longs**

En étudiant la diffusion des métabolites neuronaux et astrocytaires à des temps très longs (2000 ms), l'objectif est d'établir la potentielle sensibilité de la mesure aux paramètres d'extension spatiale du type de cellule considérée, en l'occurrence, la longueur des fibres (diffusion des métabolites majoritairement dans les fibres, cf chapitre 8). Nous appellerons génériquement « fibres » l'ensemble des processus suivants : axones, dendrites, processus astrocytaires (cf chapitre 2).

Sur l'ensemble des travaux réalisés en spectroscopie de diffusion *in vivo*, l'intervalle de temps de diffusion étudié est 11.7 ms (Duong et al., 2001) à 245 ms (Branzoli et al., 2013). Trois études issues du laboratoire sortent de ce cadre : l'une à temps de diffusion très courts, compris entre 0.94 ms et 12.9 ms, réalisée à 7 T sur rat (Marchadour et al., 2012), les deux autres, à temps de diffusion très longs, jusqu'à 1011 ms sur macaque à 7 T (Najac et al., 2014) et jusqu'à 712 ms sur humain à 7 T (Najac et al., 2016), en collaboration avec Francesca Branzoli et Itamar Ronen à Leiden, Pays-Bas.

Celle de Najac et al. (2014) montre notamment que les métabolites diffusent majoritairement dans les fibres (précisions dans le chapitre 8), plutôt que dans les corps cellulaires. Réalisée sur le macaque, à des temps de diffusion allant jusqu'à 1011 ms, elle montre que l'ADC des métabolites neuronaux ou astrocytaires reste assez stable avec l'augmentation du temps de diffusion. Ceci est caractéristique d'une diffusion libre, mais comme cette dernière se fait de manière unidirectionnelle (le long de la fibre) et est



très restreinte dans les deux directions perpendiculaires à la fibre, la mesure révèle un ADC  $\sim \frac{D_{\text{libre}}}{3}$ . La majorité du voxel que l'on regarde est donc occupé par des axones, des dendrites et des processus astrocytaires (par rapport aux corps cellulaires correspondants) et contiennent les métabolites d'intérêt.

Le paramètre d'intérêt principal auquel les longs temps de diffusion donnent accès est la longueur des fibres dans lesquelles les métabolites diffusent : au-delà d'un certain temps de diffusion, le rayon n'a plus d'impact sur la mesure ( $d^2 \ll 2t_d D_{\text{intra}}$ ). L'effet des obstacles et des épines dendritiques est aussi moyenné à des temps de diffusion suffisamment longs et résulte en une diffusion tortueuse qu'on peut inclure dans  $D_{\text{intra}}$ . Les seules formes de restriction qui peuvent alors avoir un impact sur la mesure sont la longueur finie des fibres ainsi que les ramifications rencontrées le long de ces dernières et qui décrivent la complexité de la structure considérée.

La modélisation à développer pour extraire les longueurs des fibres dans lesquelles diffusent les métabolites diffère des modèles analytiques existants. Marco Palombo, post-doctorant au laboratoire pendant les deux premières années de ma thèse, a notamment travaillé à l'optimisation des modèles numériques développés par l'équipe.

#### **6.4.1 Pourquoi la STELASER ?**

Mesurer la diffusion à des temps très longs demande un  $\Delta$  très long entre les gradients de diffusion. Les temps de relaxation transversale des métabolites sont de l'ordre de quelques centaines de millisecondes à 11.7 T ( $\sim 100$  ms pour la créatine totale jusqu'à  $\sim 350$  ms pour les composés cholinergiques (de Graaf et al., 2006)). Utiliser un simple écho de spin est donc défavorable, car au-delà d'un temps de diffusion de quelques centaines de millisecondes le signal résiduel des métabolites est beaucoup trop faible. Le temps de relaxation longitudinal augmente légèrement avec l'intensité du champ, contrairement au  $T_2$ . A 11.7 T, les métabolites d'intérêt ont un temps de relaxation longitudinal d'environ 1500 ms (tCho, NAA, Glx, tCr à 3 ppm, Ins) et celui de la taurine atteint presque 2500 ms.

L'intérêt de l'écho stimulé est immédiat : garder un temps d'écho très court et faire varier le temps de mélange (TM) en jouant avec les  $T_1$  favorables des métabolites. Cependant, plus le temps de diffusion est long, plus le TR doit être long et plus le nombre de répétitions nécessaires pour obtenir des spectres de SNR acceptable est grand.

L'absence de termes croisés (§4.4) présente également l'avantage majeur de ne pas avoir à acquérir les spectres avec les deux polarités de gradients de diffusion. Les termes croisés augmentent quand le  $t_d$  augmente. La polarité négative cause une atténuation du signal trop forte (perte de signal) et la polarité positive, une atténuation trop faible (contraste insuffisant) : comme à long  $t_d$  le signal à bruit est limité, la

variabilité des mesures d'ADC<sub>+</sub> et d'ADC<sub>-</sub> est d'autant plus importante et se répercute sur l'évaluation finale de l'ADC à temps de diffusion longs.

### 6.4.2 Méthodes spécifiques

Pour cette étude, 10 souris C57Bl/6 femelles ont été scannées plusieurs fois pour acquérir toutes les données. Pour chaque temps de diffusion, le spectre dit « à  $b=0 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  » ( $b_0$ ) est acquis avec une pondération en diffusion correspondant à des gradients de diffusion à environ 2% pour assurer un spoiling autour des impulsions RF. Le spectre pondéré en diffusion est acquis à  $b_0 + 3 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Le temps de répétition grandit avec le TM (cf table 6-2) et le TE est fixé à 31.4 ms, avec une durée de gradient fixée à  $\delta=2$  ms. Les temps de diffusion ont été choisis pour être proches de l'étude de Najac et al. (2014), menée sur le macaque jusqu'à  $t_d=1011$  ms et dont les résultats à  $t_d=2011$  ms sont présentés dans le Chapitre 5 de sa thèse.

Table 6-2 : paramètres des acquisitions.

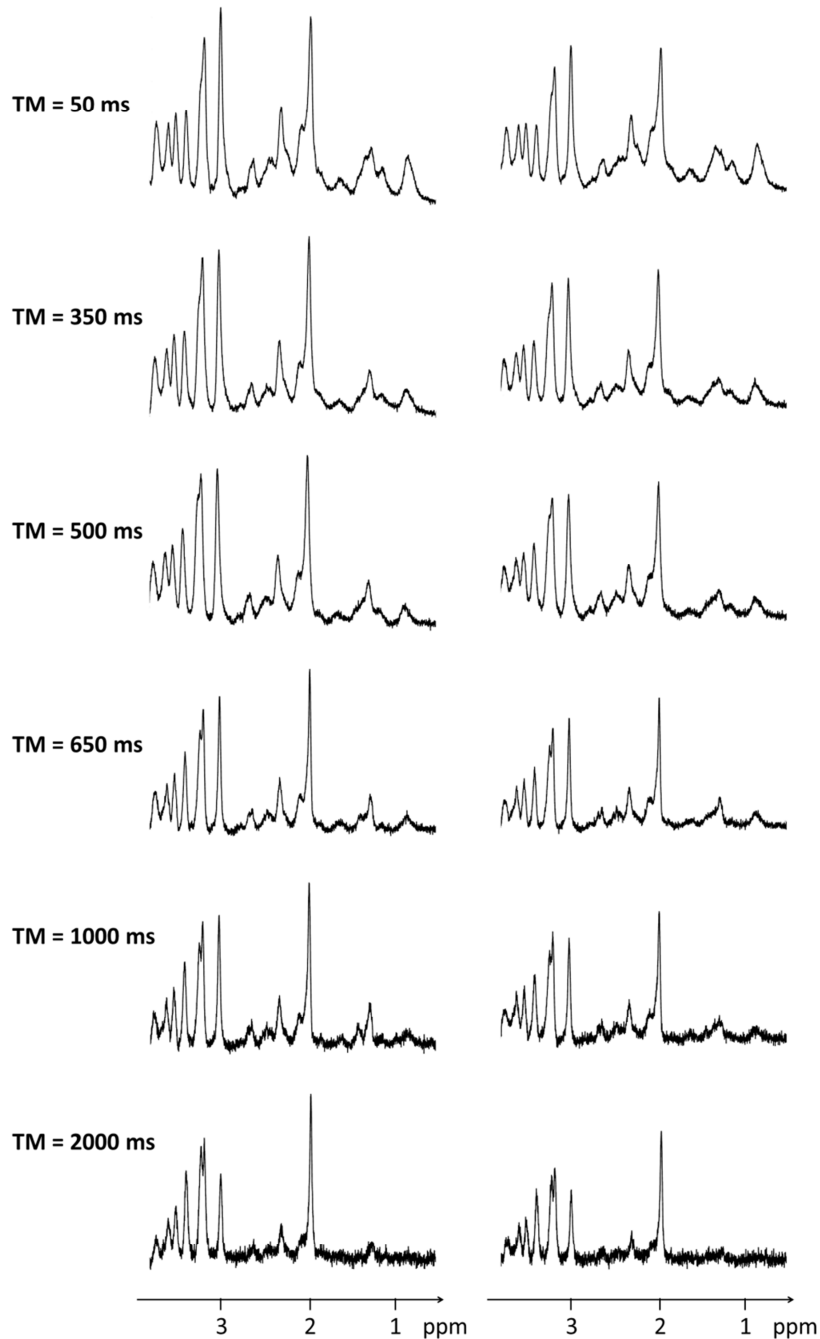
TM (ms)	$t_d$ (ms)	TR (ms)	$b_0$ (ms/ $\mu\text{m}^2$ )	$b_{DW}$ (ms/ $\mu\text{m}^2$ )
50	52	2000	0.015	3.015
350	352	3000	0.100	3.100
500	502	3000	0.150	3.150
650	652	3000	0.200	3.200
1000	1002	3000	0.300	3.300
2000	2002	4000	0.600	3.600

La séquence a été vérifiée à temps de diffusion longs sur un fantôme d'agarose (Table 6-3) pour éviter les problèmes de flux des fantômes liquides (§5.4.3). Le coefficient de diffusion de l'eau  $D_{\text{eau}}$  est parfaitement stable en fonction du temps de diffusion et  $D_{\text{eau}}=2.33 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ .

Table 6-3 : Vérification de la séquence sur fantôme d'agarose. La distribution des  $t_d$  diffère légèrement car nous avons effectué ces mesures avec les paramètres d'acquisition de la partie 3 (et TE=33.4 ms).

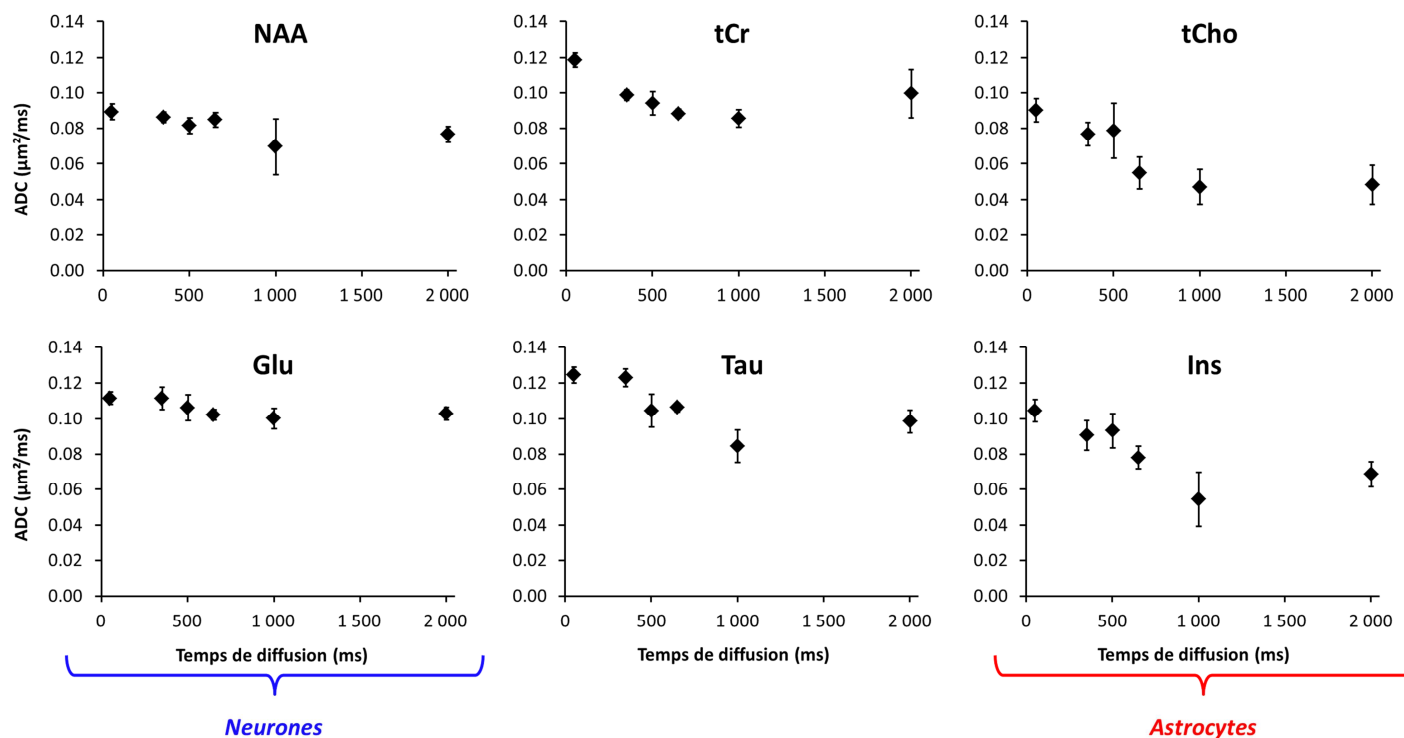
Temps de diffusion (ms)	53.2	253.2	503.2	1003.2	1503.2	2003.2
$D_{\text{eau}}$ (ms/ $\mu\text{m}^2$ )	2.33	2.34	2.32	2.34	2.34	2.31

La qualité des spectres est correcte même dans les pires conditions, c'est-à-dire pour un spectre pondéré en diffusion à  $t_d=2000$  ms (Figure 6-10).



**Figure 6-10** : Echantillon représentatif de spectres à chaque temps de diffusion, sans pondération en diffusion (gauche) et avec pondération en diffusion. Pour faciliter la visualisation, les spectres à  $b_0$  sont normalisés par rapport au pic à 2 ppm du NAA, dont le  $T_1$  est le plus long.

### 6.4.3 ADC en fonction du temps de diffusion



**Figure 6-11** : ADC en fonction du temps de diffusion pour les métabolites plutôt neuronaux (NAA, Glu), astrocytaires (Ins, tCho) et de compartimentation non préférentielle (tCr, Tau). Les barres d'erreur représentent les erreurs standards.

L'ensemble des résultats est représenté sur la Figure 6-11. La stabilité de l'ADC avec l'augmentation du temps de diffusion est globalement retrouvée chez la souris, même si une légère tendance à la baisse est notable aux temps de diffusion plus longs, en particulier pour l'Ins et les tCho.

Des similitudes sont à noter entre certaines courbes de diffusion :

- L'ADC du myo-Inositol et des composés cholinergiques, correspondant à des métabolites plutôt astrocytaires, décroît (légèrement) manière assez similaire.
- L'ADC du NAA et du Glutamate, plutôt neuronaux, est très stable.

La tCho et l'Ins semblent diffuser dans des compartiments plus petits que le NAA et le Glutamate. Il est intéressant de noter que la simple observation des données brutes permet d'obtenir une indication sur la morphologie des cellules dans lesquelles les métabolites diffusent : la modélisation apporte une idée plus

précise des paramètres qui varient, mais l'information est visible à l'oeil et en tenir compte indépendamment de ce que donnent les résultats de modélisation ou de simulation est prudent pour l'interprétation globale des données.

#### **6.4.4 Conclusion**

Ces mesures sont les premières réalisées à temps de diffusion aussi longs sur souris. La comparaison avec les données obtenues sur macaque permettent d'une part de confirmer que chez le rongeur, la diffusion des métabolites est principalement mesurée dans les fibres et d'autre part que la compartimentation des métabolites semble la même. La modélisation de ces données (Palombo et al., 2016) en partie décrite dans le chapitre 8 permet d'extraire des informations quantitatives sur la morphologie des cellules sur cerveau.

#### **6.5 Conclusion et publications associées**

Conçue pour ne pas contenir de termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie lors du calcul de la pondération en diffusion, la séquence STELASER nous permet d'étudier une large échelle de temps de diffusion avec des spectres de métabolites localisés.

Les mesures à haute pondération en diffusion nous permettent de conclure qu'il n'y a pas ou peu de dépendance de l'atténuation du signal à la relaxation pour la créatine totale, les composés cholinergiques, le glutamate, le myo-inositol et la taurine dans des conditions d'acquisition proches des nôtres (intervalle de TE/TM, voxel d'acquisition). La géométrie des cellules dans lesquelles diffusent les métabolites module donc principalement l'atténuation du signal mesurée. Le N-acétylaspartate semble présenter une légère dépendance au TE à hautes pondérations en diffusion, ce dont nous discutons dans le chapitre 8, en parallèle de la modélisation réalisée pour extraire les paramètres géométriques des compartiments relatifs à la diffusion de chaque métabolite à  $t_d=63$  ms.

L'absence de termes croisés facilite les mesures d'ADC à temps de diffusion très longs. Nous avons pu mesurer l'ADC des 6 métabolites principaux pour des temps de diffusion allant de 50 à 2000 ms. L'exploitation par la modélisation (chapitre 8) de ces résultats permet de quantifier l'extension spatiale des cellules associées à chaque type de métabolite (NAA et Glu dans les neurones, tCho et Ins dans les astrocytes).

## Publications associées

### *Articles scientifiques*

Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2017). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(4), 1390–1398. doi:10.1002/mrm.26217

Palombo, M., Ligneul, C., Najac, C., Le, J., Flament, J., & Escartin, C. (2016). New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24), 6671–6676. doi:10.1073/pnas.1504327113

### *Poster électronique*

Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2016). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: revisiting the correlation between relaxation and diffusion properties. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 24*.

## CHAPITRE 7

### Les gradients oscillants pour l'exploration des temps ultra-courts

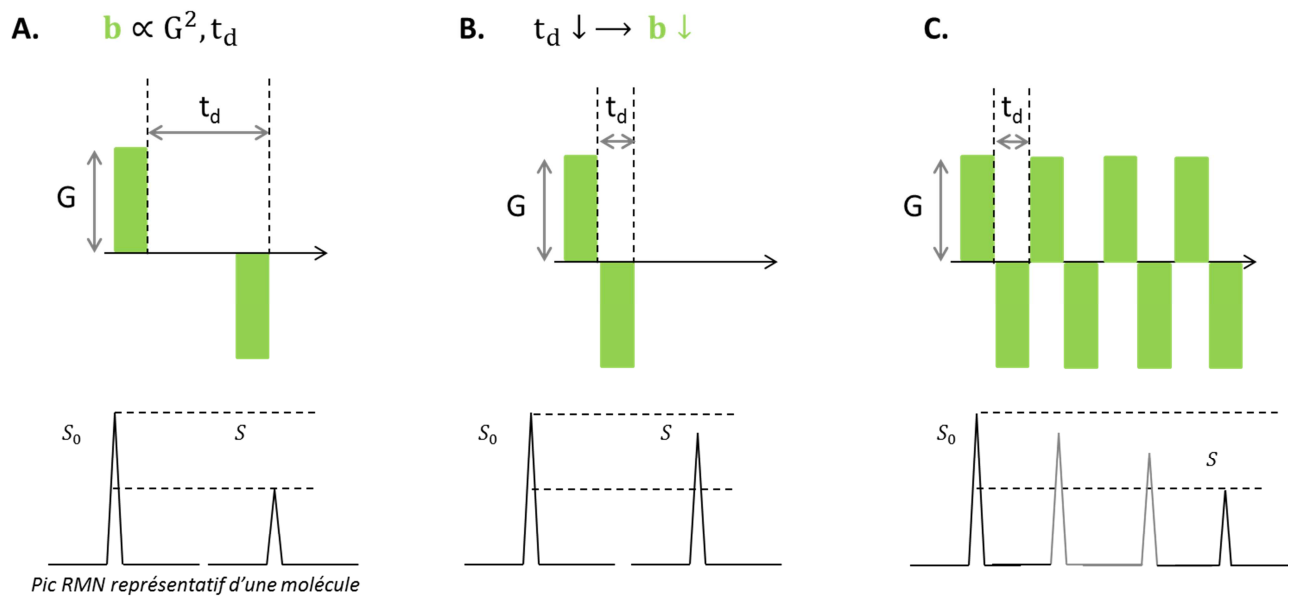
---

Aux temps de diffusion très courts (1 à 5 ms), un métabolite n'a le temps de parcourir qu'une toute petite distance et a peu de chance d'entrer en collision avec la membrane de la cellule par exemple. Lorsqu'on s'intéresse à des temps de diffusion réellement très courts, c'est comme si la diffusion était libre dans le cytosol de la cellule : cela donne donc accès à des propriétés caractéristiques de la cellule telles que la viscosité du cytosol, ou l'encombrement cellulaire protéique. La diminution du temps de diffusion s'accompagne donc d'une augmentation des ADC des métabolites. A des temps infiniment courts, l'ADC atteint une limite correspondant au coefficient de diffusion libre dans le cytosol (chapitre 2).

Les méthodes développées aux temps de diffusion courts proviennent aussi du besoin pour les industriels du pétrole de développer des outils qui permettent de connaître la structure poreuse d'une roche (Mitra, Sen, etc).

Le premier réflexe pour raccourcir le temps de diffusion dans une séquence classique, telle qu'un écho de spin ou un écho stimulé est de rapprocher les gradients de diffusion pour raccourcir  $\Delta$ . Comme la pondération en diffusion est aussi liée à  $\Delta$ , si l'on souhaite pondérer suffisamment la mesure, il faut compenser cette perte en augmentant l'intensité des gradients qui doivent rester de courte durée. Les limites sont très vite atteintes, même sur des scanners IRM précliniques avec des gradients intenses. Pour contourner ce problème, il est possible de répéter plusieurs fois l'alternance de gradients de diffusion avec une intensité modérée (Figure 7-1): le temps de diffusion reste dépendant de la fréquence du changement de polarité, mais la pondération en diffusion augmente avec la durée totale des gradients. C'est en 1969 que Gross et Kosfeld proposent l'utilisation des gradients oscillants pour la mesure de la diffusion à des temps très courts. En pondérant une séquence de spectroscopie (LASER dans notre cas) avec ces gradients oscillants, il est possible de mesurer la diffusion des métabolites d'intérêt à des temps très courts.

L'utilisation de ces gradients pour l'exploration *in vivo* des propriétés relatives aux courtes distances de diffusion est peu répandue dans la littérature. Quelques études se penchent sur la diffusion de l'eau à des temps de diffusion inférieurs à 5 ms, chez le rongeur (Does et al., 2003 ; Reynaud et al., 2015) et chez l'humain (Baron et Beaulieu, 2014 ; Van et al., 2014 ; Fieremans et al., 2015). Seule l'étude de Marchadour et al. (2012) s'intéresse à la spectroscopie de diffusion *in vivo* chez le rat à 7 T, rapportant les ADC des tCho, de la tCr et du NAA, pour des temps de diffusion compris entre 0.94 ms et 12.9 ms.



**Figure 7-1** : Principe et intérêt du gradient oscillant : conserver une pondération en diffusion raisonnable à des temps de diffusion très courts. (A) Dans une expérience avec des gradients pulsés, une intensité  $G$  est nécessaire à un temps de diffusion  $t_d$  pour assurer un contraste de diffusion suffisant, caractérisé par une atténuation quantifiable du pic de la molécule sur le spectre. (B) A une intensité de gradient fixée, raccourcir le temps de diffusion entraîne une diminution la pondération en diffusion. (C) La pondération en diffusion peut être augmentée progressivement en répétant  $N$  fois le schéma de diffusion avec des gradients bipolaires.

L'étude présentée ci-après a pour but d'une part de reproduire l'étude de Marchadour et al. (2012), mais sur souris à 11.7 T et d'autre part de raccourcir le temps d'écho pour pouvoir détecter plus de métabolites tout en conservant une bonne pondération en diffusion.

## 7.1 Le formalisme fréquentiel

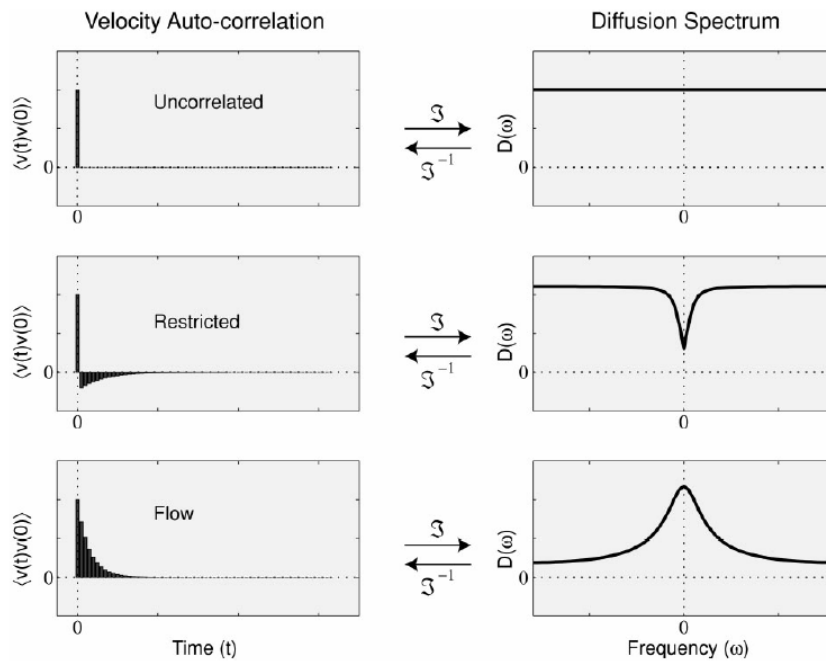
Les expériences RMN à gradients de champs pulsés sont bien décrites dans le domaine temporel avec le propagateur qui décrit la probabilité qu'un spin se déplace d'une distance  $x$  le long de la direction du gradient pendant le temps  $\Delta$ , pour  $\Delta \gg \delta$  (approximation SGP). Le caractère périodique des gradients oscillants invite au formalisme fréquentiel. Stepisnik l'a introduit en 1981 puis exhaustivement décrit en 1985. L'effet du gradient est alors traité en considérant l'accumulation de phase d'un spin au cours du temps et la fonction d'autocorrélation des vitesses est préférée au propagateur, permettant de surcroît de ne pas dépendre de l'hypothèse  $\Delta \gg \delta$ , irréalisable pour l'étude des temps de diffusion très courts. Callaghan et Stepisnik développent cette approche pour le traitement de gradients « oscillants » en 1995.



La transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation des vitesses est alors tout simplement le tenseur de diffusion :

$$\mathbf{D}(\omega) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} \exp(i\omega t) \langle \mathbf{v}(t)\mathbf{v}(0) \rangle dt \quad (7-1)$$

Ainsi, le tenseur de diffusion, au sens de l'échantillonnage en fréquence, aura une allure différente en fonction de la fréquence selon que la diffusion est libre, restreinte ou active (Figure 7-2).



**Figure 7-2 :** Allure de  $D(\omega)$  en fonction de la fréquence, selon que la diffusion est libre ( $v(0)$  et  $v(t)$  décorrélées, en haut), restreinte (au milieu) ou active (en bas). Extrait de Does et al. (2003).

Le spectre de modulation du gradient  $\mathbf{F}(\omega)$  correspond à la transformée de Fourier de  $\mathbf{k}(t) = \gamma \int_0^t \mathbf{G}(t') dt'$ . Soit :

$$\mathbf{F}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\omega t) \mathbf{k}(t) dt \quad (7-2)$$

$|\mathbf{F}(\omega)|^2$  permet de visualiser les fréquences sélectionnées par le gradient inséré dans la séquence. Comme les gradients ne sont pas infinis, il y a nécessairement des lobes secondaires qui polluent plus ou moins la qualité de la sélection de fréquence.

L'atténuation du signal, relative à l'amplitude de l'écho qui suit le gradient de diffusion, est décrite ainsi aux petites valeurs de b :

$$\frac{S}{S_0} = \exp\left(-\frac{1}{\pi} \int_0^\infty \mathbf{F}(\omega) \mathbf{D}(\omega) \mathbf{F}(\omega) d\omega\right) \quad (7-3)$$

## 7.2 Gradients oscillants optimisés implémentés dans une séquence LASER

Une des limitations de l'utilisation des gradients oscillants est l'impact sur le temps d'écho : pour obtenir une pondération en diffusion suffisante, il faut répéter un certain nombre de fois la période d'intérêt. Or, notamment en spectroscopie, il est nécessaire d'avoir un temps d'écho assez court pour pouvoir observer suffisamment de métabolites, et ce avec assez de signal.

Pour une expérience donnée on va donc en général fixer le temps d'écho et ensuite diviser en N périodes le temps alloué aux gradients dans la séquence. Plus le N est grand, moins la pondération maximale atteignable est importante. L'idée étant d'avoir la fréquence la plus grande possible pour atteindre le temps de diffusion le plus court possible, il faut optimiser la forme des gradients pour faire le moins de concession possible sur la pondération en diffusion b.

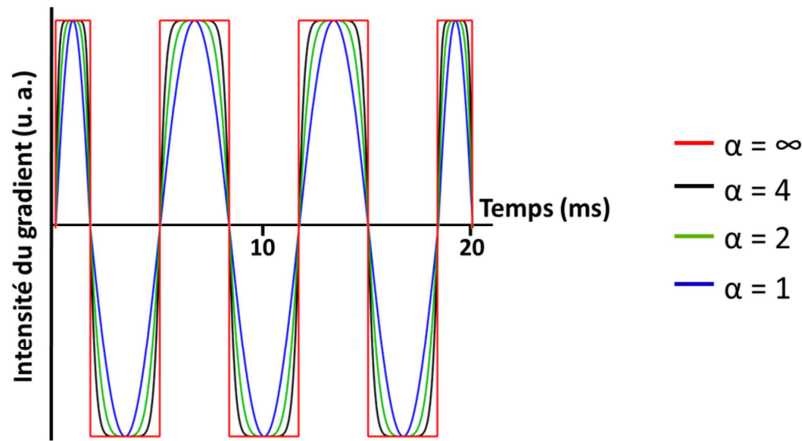
### 7.2.1 Le cosinus apodisé étiré

Parmi l'ensemble des formes de gradients oscillants proposées dans l'étude de Does et al. (2003), le cosinus dit « apodisé » (Equation 7-4) est celui qui présente la meilleure sélection fréquentielle (pas de lobe à 0 et lobes résiduels faibles à hautes fréquences). Une forme cosinus de fréquence  $\omega$  serait idéale mais le temps de montée fini des gradients est incompatible avec elle. Le premier et le dernier quart de période sont donc remplacés par des lobes sinusoïdaux de fréquence  $2\omega$  : les composantes spectrales de  $\mathbf{F}(\omega)$  sont simplement un peu plus larges et  $\mathbf{k}(T)=0$ , avec T la durée totale de gradient. Pour une intensité maximale de gradient  $G_{\max}$ , un nombre de périodes N et une fréquence  $\omega = \frac{2\pi N}{T}$ , la forme est simple :

$$\begin{aligned} G_{\max} \sin(2\omega t) & \text{ pour } 0 \leq t < \frac{T}{4N} \\ g(t) = G_{\max} \cos(\omega t) & \text{ pour } \frac{T}{4N} \leq t < T - \frac{T}{4N} \\ G_{\max} \sin(2\omega t) & \text{ pour } T - \frac{T}{4N} \leq t < T \end{aligned} \quad (7-4)$$

La pondération en diffusion en fonction de l'intensité du gradient se déduit analytiquement,  $b = \frac{1}{8} \left(\frac{\gamma G}{\pi N}\right)^2 T^3 \left(1 - \frac{1}{8N}\right)$  en exprimant l'atténuation du signal comme étant  $\frac{S}{S_0} = \exp(-b \cdot \text{ADC})$  avec  $b =$

$\int_0^T k^2(t)dt$ . En comparant les expressions de  $b$  entre une expérience à gradients de champ pulsés ( $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 t_d$ ) et une expérience à gradients oscillants, Gross et Kosfeld ont défini un temps effectif de diffusion pour les gradients oscillants. S'agissant du cosinus apodisé, ce temps effectif de diffusion vaut  $t_d = \frac{T}{4N}$ . Il est plus court que celui des formes sinusoïdales et donc mieux adapté à l'étude des temps de diffusion courts. Lorsque le régime de Mitra est atteint (cf §7.7), le temps effectif de diffusion est encore plus court et vaut  $t_{d,Mitra} = \frac{9T}{32 \cdot 2N}$ . Les expressions des temps de diffusion proposées ici sont approximatives et n'ont pas de sens parfaitement défini, c'est pourquoi nous présentons principalement les résultats en fonction de la fréquence.



**Figure 7-3:** Gradients oscillants étirés de  $\alpha=1$  (en bleu, correspondant au cosinus apodisé normal) à  $\alpha \rightarrow \infty$  (en rouge, créneau oscillant).  $\alpha = 4$  en noir.

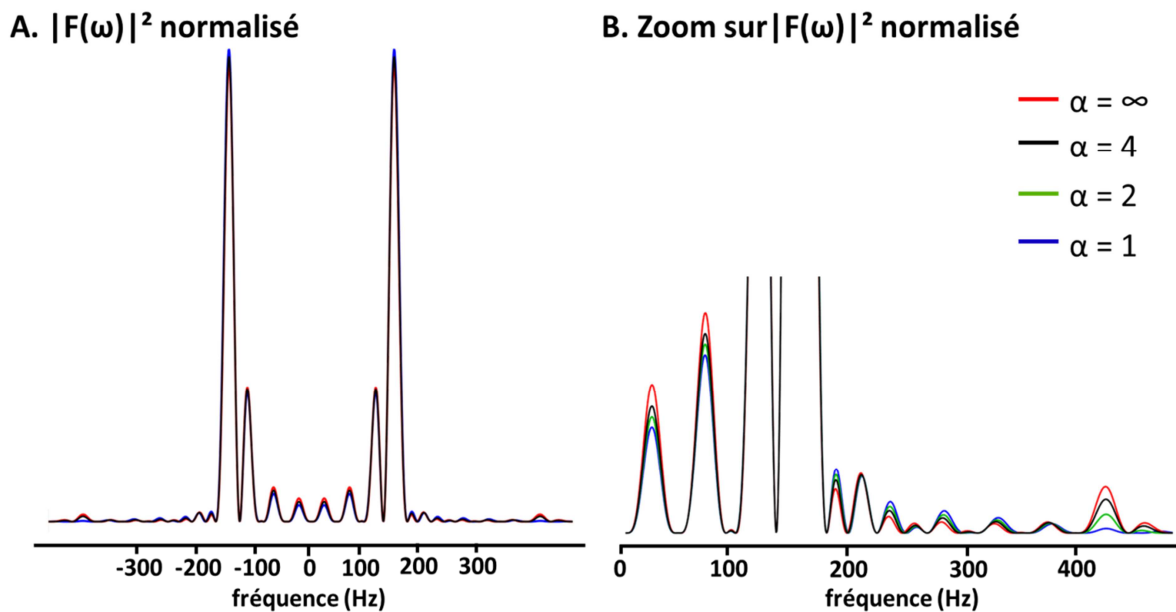
Pour pouvoir augmenter la contribution à la pondération en diffusion de chaque lobe, nous avons « étiré » le sommet des lobes du cosinus apodisé (Figure 7-3) en introduisant un exposant  $\alpha$  à l'intérieur de ce dernier.

La forme de ce gradient cosinus apodisé étiré s'écrit alors :

$$\begin{aligned}
 & G_{\max} \cos\left(\frac{\pi}{2} \left(\frac{8Nt}{T} - 1\right)^\alpha\right) && \text{pour } 0 \leq t < \frac{T}{4N} \\
 G(t) = & (-1)^{k+1} G_{\max} \cos\left(\frac{\pi}{2} \left(2 \left(\frac{4Nt}{T} - k\right) - 1\right)^\alpha\right) && \text{pour } \frac{T}{4N} \leq t < T - \frac{T}{4N}, k = E\left(\frac{4Nt}{T}\right) \quad (7-5) \\
 & G_{\max} \cos\left(\frac{\pi}{2} \left(\frac{8Nt}{T} - 8N + 1\right)^\alpha\right) && \text{pour } T - \frac{T}{4N} \leq t < T
 \end{aligned}$$

$E$  est la fonction partie entière.

Le calcul analytique de  $b$  pour la forme générale du cosinus apodisé étiré est irréalisable avec des outils mathématiques simples, nous nous sommes donc contentés du calcul numérique pour la quantification du gain en  $b$  par rapport au cosinus apodisé classique et pour l'implémentation sur Paravision 6.0. L'ensemble des résultats de cette étude sont donc présentés en fréquence et non en temps de diffusion, car d'une part l'approche fréquentielle générale s'y prête et d'autre part nous n'avons pas extrait d'expression analytique pour le temps effectif de diffusion non plus (sauf lorsque le régime de Mitra est atteint).



**Figure 7-4 :** Allure de  $|F(\omega)|^2$  selon  $\alpha$  en fonction de la fréquence et normalisée pour donner la même pondération en diffusion.

Pour tenir compte de l'impact de l'ensemble des lobes secondaires sur la sélection de fréquence (Figure 7-4), nous avons déterminé le barycentre de  $|F(\omega)|^2$ ,  $\omega > 0$  pour calculer une fréquence effective  $\omega_{\text{eff}}$  :

$$\omega_{\text{eff}} = \frac{\int_0^{\infty} \omega |F(\omega)|^2 d\omega}{\int_0^{\infty} |F(\omega)|^2 d\omega} \quad (7-6)$$

## 7.2.2 Gain sur la pondération en diffusion

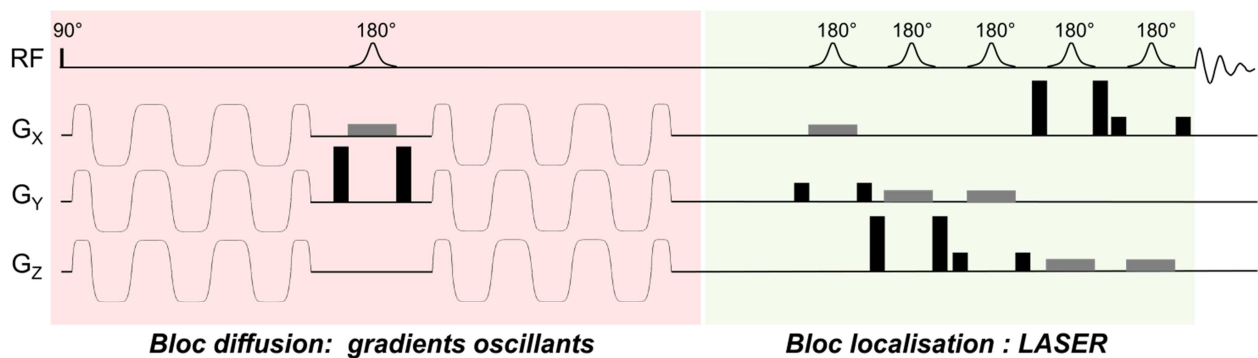
L'intégrale de  $|F(\omega)|^2$  décrit  $b$  (Figure 7-4), et elle augmente avec  $\alpha$ . Le gain en  $b$  par rapport au cosinus apodisé classique (correspondant aussi à  $\alpha = 1$ ) en fonction de  $\alpha$ ,  $s(\alpha)$ , est borné. Pour  $\alpha \rightarrow \infty$ , c'est-à-dire pour créneau oscillant,  $s(\alpha) = 1.72$ . Le gain se fait surtout aux premières valeurs de  $\alpha$  et  $s(\alpha = 4) = 1.56$ . Le

cosinus apodisé étiré à  $\alpha = 4$  nous a semblé être le bon compromis entre le respect des contraintes de la machine et le gain très honorable de 56% en b.

D'autres formes de gradients oscillants peuvent être utilisées pour optimiser la pondération en diffusion. Le créneau oscillant est inenvisageable à cause du temps fini de montée des gradients. Le trapèze oscillant, calibré pour atteindre l'intensité maximale des gradients dans le temps de montée imposé par la machine, est la forme de gradients oscillants qui maximise la pondération en diffusion. Nous l'avons utilisée pour une campagne d'expériences à temps de diffusion ultra-court ( $\sim 0.2$  ms), décrite en §7.7. Le gain en b par rapport au cosinus apodisé classique est alors de 1.70 mais les contraintes sur la machine sont très fortes et risquent d'abîmer le gradient prématurément, ce qui n'était pas raisonnable sur un scanner IRM utilisé à plein temps par les différentes équipes du laboratoire.

### 7.2.3 La séquence : LASER asymétrique pondérée en diffusion

La séquence a d'abord été pensée (Thèse Charlotte Marchadour 2012) en pondérant la séquence LASER avec les gradients oscillants entre chaque doublet d'impulsions adiabatiques. Mais cela ajoutait une périodicité à la séquence et dégradait la qualité de la sélection de fréquence. En outre, la fréquence minimale, utile pour rallier les temps de diffusion plus longs, était imposée par la courte durée disponible entre les paires d'impulsions. Pour pallier ce problème, la séquence a été modifiée en insérant deux trains de gradients oscillants de durée T de part et d'autre de la première impulsion AFP de la séquence LASER pour donner une séquence LASER asymétrique pondérée en diffusion (Figure 7-5).



**Figure 7-5** : Séquence LASER pondérée en diffusion (gradient cosinus étiré).

L'optimisation de la forme des gradients a permis un gain considérable sur le temps d'écho : pour une pondération maximale à la plus haute fréquence de  $b=1.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$ , le temps d'écho résultant est de 60 ms. L'étude précédente menée sur rat avec le scanner IRM Varian 7 T (Marchadour 2012) avait été réalisée avec TE=154 ms et une pondération maximale à la plus haute fréquence  $b=1$  ms/ $\mu\text{m}^2$ . L'intensité

maximale des gradients  $G_{\max,7T} = 600$  mT/m défavorable par rapport au scanner IRM Bruker 11.7 T  $G_{\max,11.7T} = 752$  mT/m permet de base de gagner un facteur  $\frac{G_{\max,11.7T}^2}{G_{\max,7T}^2} = 1.57$  sur la longueur des gradients et donc de raccourcir le à TE = 110 ms, uniquement grâce au changement de machine. L'optimisation du bloc LASER permet également de gagner 14 ms sur le temps d'écho. Donc l'optimisation de la forme des gradients a réellement permis de passer d'un TE ~ 100 ms à TE = 60 ms et une pondération maximale à la plus haute fréquence  $b=1.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$ .

Malgré la diminution du  $T_2$  des métabolites qu'implique l'augmentation du champ, cette réduction drastique du temps d'écho, couplée l'augmentation du champ et l'utilisation de l'antenne cryogénique, permet de détecter plus de métabolites avec un meilleur signal à bruit. La taurine et le myo-inositol deviennent notamment quantifiables avec des CRLB < 5%, ainsi qu'un signal de macromolécules correct à 0.9 ppm.

### 7.3 Méthodes spécifiques

Sur les 60 ms de temps d'écho, 40 ms sont allouées aux gradients de diffusion (deux blocs de T=20 ms) et le reste correspond à la localisation LASER. Le temps de répétition est fixé à TR=3000 ms. Un module VAPOR est ajouté en amont de la séquence pour supprimer l'eau. Les gradients de diffusion sont appliqués sur les trois axes simultanément, avec un coefficient  $\alpha=4$ . Cinq fréquences  $\omega_{\text{eff}}$  sont étudiées (49, 99, 150, 201 et 252 Hz), correspondant à des temps de diffusion allant grossièrement de 5 à 1 ms. Au temps de diffusion le plus court (à la plus haute fréquence), un métabolite dont l'ADC vaut environ 0.3  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  explore une distance d'environ 0.8  $\mu\text{m}$ . Deux types d'expériences ont été réalisés :

- Des acquisitions à hautes valeurs de pondération en diffusion aux basses fréquences. Pour  $\omega_{\text{eff}}=49, 99$  Hz, l'atténuation du signal a été mesurée pour  $b$  allant jusqu'à 8 ms/ $\mu\text{m}^2$ , avec un pas de 1 ms/ $\mu\text{m}^2$ . Cela nous a permis de vérifier le comportement monoexponentiel de  $\frac{S}{S_0}$ , nous permettant de calculer l'ADC des métabolites qu'à partir de deux valeurs de  $b$ , ainsi que de quantifier plus spécifiquement pour notre étude l'atténuation du signal des macromolécules.
- Des acquisitions à toutes les fréquences à  $b=1.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$  (correspondant au maximum de pondération en diffusion que l'on peut atteindre pour  $\omega_{\text{eff}}=252$  Hz) avec un spectre de référence sans pondération en diffusion à  $b=0$  ms/ $\mu\text{m}^2$ . L'ADC est ensuite simplement calculé ainsi : 
$$\text{ADC} = -\frac{1}{b} \ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$$
. Ces expériences correspondent au cœur de l'étude.

Chaque spectre a été acquis dans un voxel de  $6 \times 2.4 \times 5$  mm<sup>3</sup> en 64 répétitions, rephasées individuellement.

Bien que le temps d'écho ait été raccourci au maximum, le glutamate est encore difficilement quantifiable. Son  $T_2$  est le plus court des métabolites cérébraux observés. D'après des mesures de  $T_2$  réalisées chez le rat in vivo à 9.4 T et à 14.1 T par Xin et al. (2008, 2013) pour les métabolites avec un couplage scalaire, celui du glutamate est compris entre 76 ms et 89 ms, soit plusieurs dizaines de millisecondes plus court que celui du NAA (142-202 ms), de la tCr (107-114 ms), des tCho (148-178 ms), de l'Ins (97-148 ms) et de la Tau (82-93 ms). La taurine a un  $T_2$  à peine plus important que celui du glutamate, et même si ses CRLB sont inférieurs à 5%, la quantification n'est pas excellente (ce qui se ressent sur les résultats, cf §7.5).

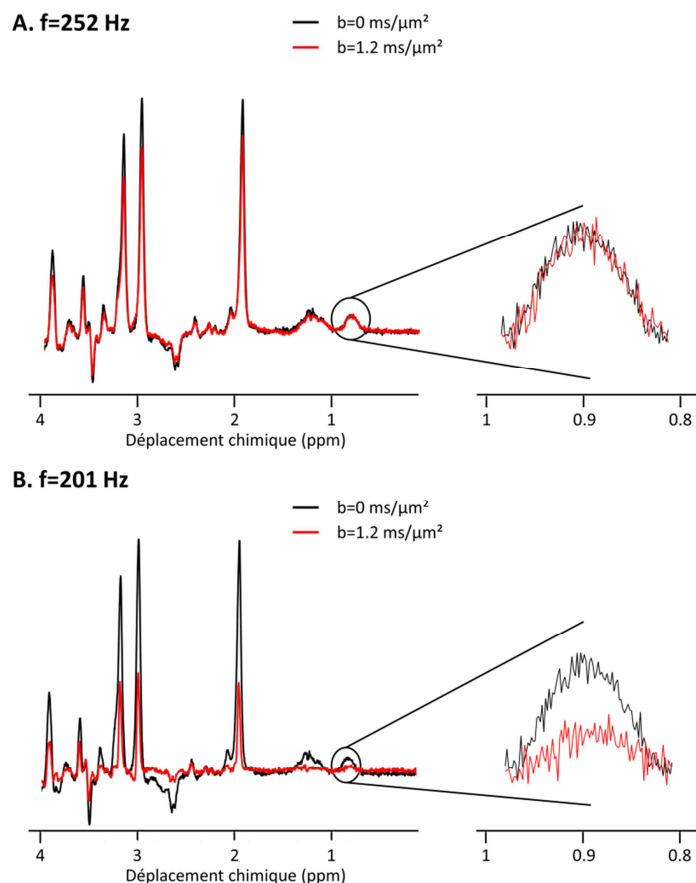
#### 7.4 Les macromolécules : un contrôle interne

Les macromolécules résonnent en partie sous certains métabolites d'intérêt et leurs résonances sont larges et mal définies. La plupart des expériences de spectroscopie in vivo n'en tiennent pas compte ou alors les soustraient grossièrement, car elles sont difficilement quantifiables. Ce sont de grosses molécules peu mobiles avec un temps de relaxation transversale très court. Lorsque le temps d'écho est suffisamment court, il est possible de détecter une résonance de macromolécules autour de 0.9 ppm, qui a la particularité d'être bien isolée du reste du spectre. Comme nous le décrivons dans les paragraphes §5.3.1 et §6.3.5, les macromolécules diffusent effectivement très peu.

Lors des premières expériences réalisées avec les gradients optimisés, il est arrivé plusieurs fois que les ADC de l'ensemble des métabolites soient très élevés à 150 et 200 Hz et reprennent une valeur normale à 250 Hz (la fréquence la plus élevée où l'on devrait théoriquement observer les ADC les plus hauts). En observant plus précisément les spectres de ces séries d'acquisitions, nous avons constaté que le signal des macromolécules des spectres correspondant aux ADC trop élevés baisse massivement sur les spectres, alors qu'il est quasiment stable aux autres fréquences (Figure 7-6). Compte-tenu de la faible diffusivité des macromolécules, cette chute du signal des macromolécules met en évidence la présence d'un artefact de mouvement à certaines fréquences.

Sous réserve de quantifier décentement le pic des macromolécules à 0.9 ppm, il est possible d'utiliser ce dernier comme référence interne et comme critère de qualité. Nous avons introduit le facteur M défini comme le ratio des aires de la région 0.8-1.0 ppm des spectres avec et sans pondération en diffusion. Les spectres sont bien entendus recalés en phase et en fréquence et un offset est appliqué au spectre si besoin pour ramener la ligne de base à 0 avant l'opération.

$$M = \frac{\int_{0.8}^{1.0} S_{DW} dppm}{\int_{0.8}^{1.0} S_0 dppm} \quad (7-7)$$

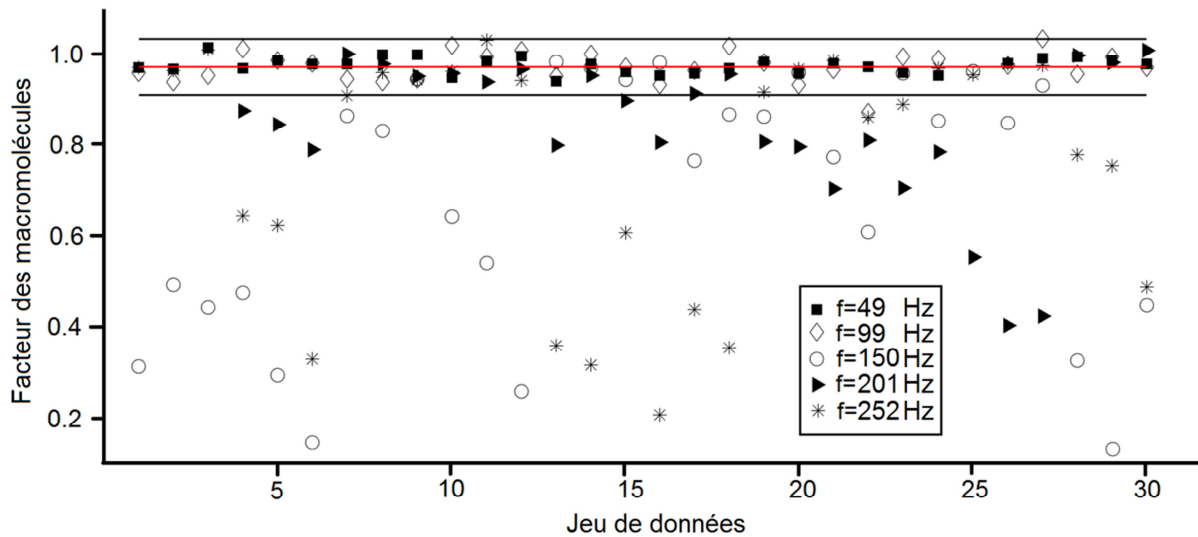


**Figure 7-6** : Atténuation du signal des macromolécules (pic à 0.9 ppm) à 201 Hz ( $M=0.40$ ) et 252 Hz ( $M=0.98$ ) sur un jeu de données acquis en une session.  $M$  défini par l'équation 7-7. Un artefact corrompt clairement le jeu de données à 201 Hz, l'atténuation du signal de macromolécules est trop importante.

$M$  est donc caractéristique de l'atténuation du signal des macromolécules et a été calculé pour tous les spectres, à toutes les fréquences (Figure 7-7). D'après les mesures à hautes pondération en diffusion (7-e),  $ADC_{MM}=0.026 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  donc on attend une atténuation  $M_{\text{théorie}} = \exp(-0.026 \times 1.2) = 0.97$ . Il arrive que  $M > M_{\text{théorie}}$ . Ceci correspond au bruit de la mesure. Pour définir rigoureusement la fourchette acceptable de l'atténuation des macromolécules sur l'ensemble des acquisitions, nous avons choisi de prendre le maximum  $M_{\text{max}}$  tous spectres et toutes fréquences confondus et de ne conserver que les spectres pondérés en diffusion dont l'atténuation  $M$  correspond à la fourchette de bruit :  $M_{\text{théorie}} - |M_{\text{max}} - M_{\text{théorie}}| < M < M_{\text{max}}$ . En deçà de cette limite, nous considérons que l'acquisition a



probablement été polluée par un artefact de mouvement et ne peut donc plus être considérée pour l'évaluation de la diffusion des métabolites d'intérêt.



**Figure 7-7 :** Facteur M caractéristique de l'atténuation des macromolécules calculé pour toutes les acquisitions. La ligne rouge correspond à l'atténuation attendue. Les acquisitions retenues sont celles comprises entre les deux lignes noires, propres au bruit de la mesure.

La Table 7-1 rapporte le nombre d'acquisitions rejetées par fréquence. Les fréquences les plus basses ( $\omega_{\text{eff}}=49, 99$  Hz) sont manifestement épargnées par les artefacts de mouvements. La littérature relative aux gradients oscillants (Parsons et al., 2003&2006, *in vitro* à partir de 800 Hz) montre en général une augmentation de l'écart type des ADC obtenus aux hautes fréquences, pointant peut être du doigt parfois un artefact de mouvement. La fréquence  $\omega_{\text{eff}}=150$  Hz est la plus touchée par l'artefact de mouvement.

Table 7-1 : Nombre d'acquisitions totales et rejetées pour chaque fréquence.

Fréquence f (Hz)	Nombre d'acquisitions total	Nombre d'acquisitions rejetées
49	29	0
99	29	1
150	30	21
201	27	15
252	30	15

La vérification sur fantôme (eau libre) n'a révélé aucun artefact de mouvement lié au mouvement des seuls gradients (Table 7-2). La mesure a été répétée 10 fois sur un même fantôme d'eau à chaque fréquence et les déviations standard sont toujours équivalentes. Cependant, comme ces artefacts ne semblent pas être systématiques, il est possible qu'ils n'aient pas été détectés au moment des expériences sur fantôme.

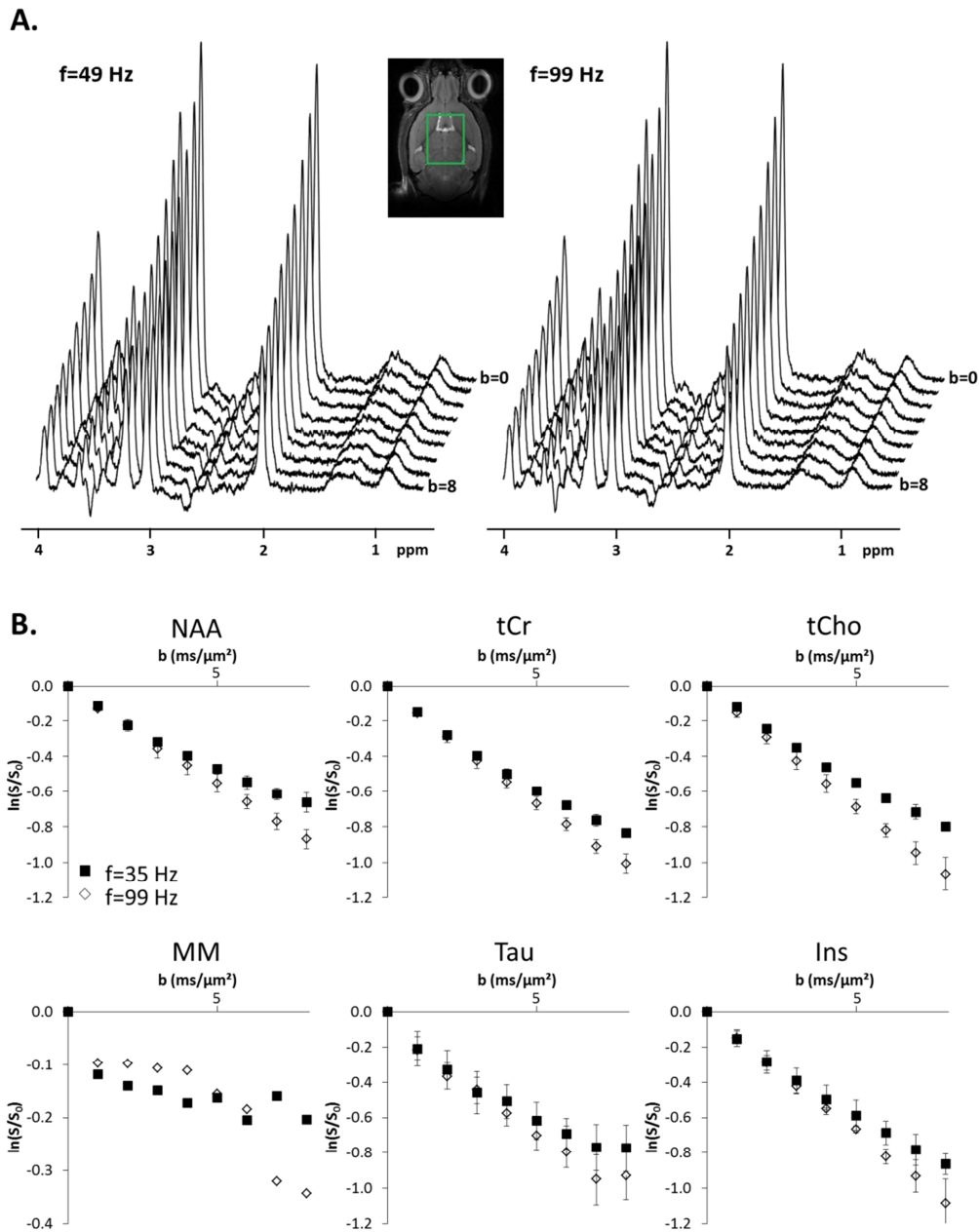
Table 7-2 : Coefficient de diffusion de l'eau dans un fantôme d'eau standard à chaque fréquence.

Fréquence (Hz)	49	99	150	201	252
ADC <sub>eau</sub> (μm <sup>2</sup> /ms)	2.20 ± 0.02	2.25 ± 0.02	2.24 ± 0.02	2.23 ± 0.02	2.25 ± 0.03

## 7.5 Les résultats

### 7.5.1 Les hautes valeurs de b pour les gradients oscillants

A la fréquence la plus basse (49 Hz), il est possible d'augmenter la pondération en diffusion à 30 ms/μm<sup>2</sup> et à 99 Hz il est possible d'aller jusqu'à b=8 ms/μm<sup>2</sup>. A chaque session nous avons donc mesuré l'atténuation du signal jusqu'à b=8 ms/μm<sup>2</sup> à 49 Hz et à 99 Hz, pour avoir une comparaison directe entre ces deux fréquences. Pour tous les métabolites étudiés, l'atténuation est monoexponentielle comme le montre la Figure 7-8 (R<sup>2</sup>>0.99 pour le NAA, la tCr, la tCho et l'Ins; la taurine est un peu plus bruitée, surtout aux hautes valeurs de b). Elle est également clairement dépendante de la fréquence. Les fréquences 49 et 99 Hz étant peu touchées par les artefacts de mouvements, elles se prêtent bien à l'étude des macromolécules. L'atténuation du signal de ces dernières est beaucoup plus bruitée. Une régression linéaire entre b=0 et b=5 ms/μm<sup>2</sup> donne ADC<sub>MM,49Hz</sub>=0.028 μm<sup>2</sup>/ms et ADC<sub>MM,99Hz</sub>=0.024 μm<sup>2</sup>/ms, menant à un coefficient moyen ADC<sub>MM</sub>=0.026 μm<sup>2</sup>/ms. Cette valeur est comparable à celle obtenue avec les expériences à très hautes pondération en diffusion décrites dans le chapitre 6 (§6.3.5).

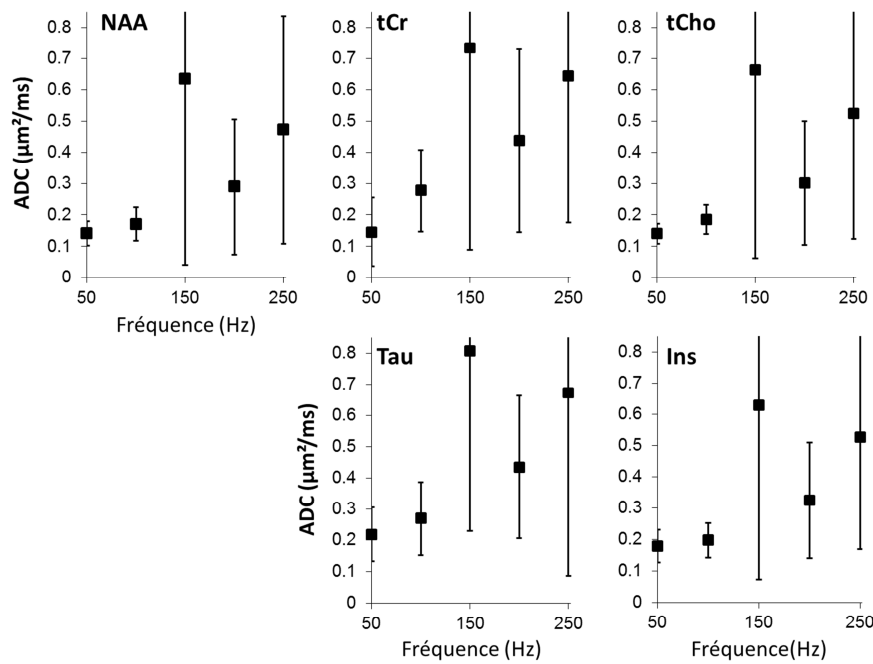


**Figure 7-8** : A. Spectres caractéristiques de l'atténuation du signal en fonction de  $b$  aux deux fréquences les plus basses ( $\omega_{eff}=49$  Hz et 99Hz). B. Atténuation du signal en fonction de  $b$  aux fréquences ci-dessus. Moyenne sur 4 animaux.

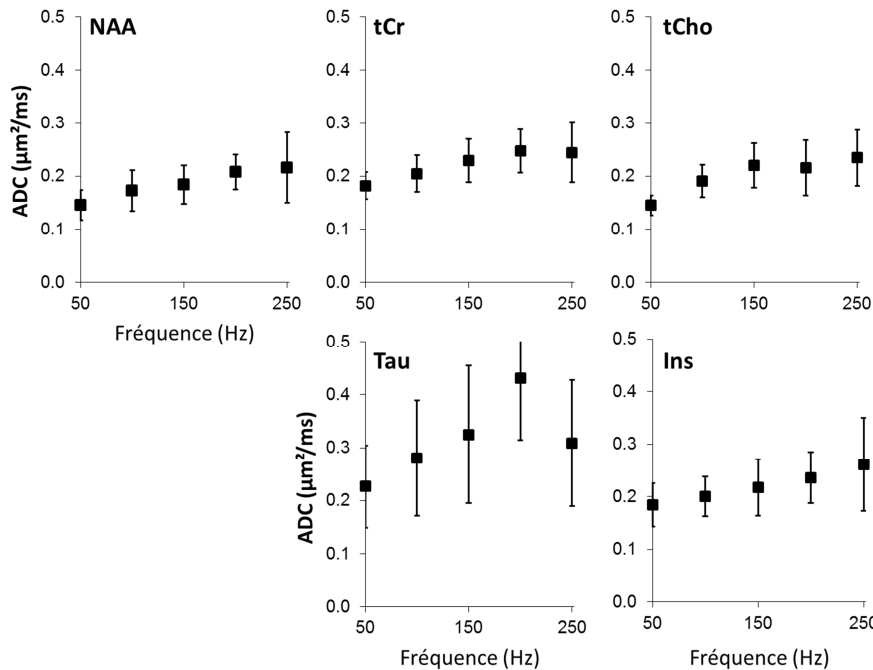
### 7.5.2 L'ADC en fonction de la fréquence

L'évolution de l'ADC de chaque métabolite en fonction de la fréquence est représentée Figure 7-9-B. La Figure 7-9-A correspond à cette évolution avant le tri effectué grâce au facteur des macromolécules.

### A. Avant tri



### B. Après tri (basé sur le facteur des macromolécules)



**Figure 7-9 :** ADC des cinq métabolites d'intérêt en fonction de la fréquence (A) lorsque toutes les acquisitions sont moyennées à chaque fréquence ou (B) lorsque les acquisitions sont sélectionnées selon le critère de l'atténuation des macromolécules. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

Le gain sur la qualité et l'allure de la mesure est très net. Physiquement, il n'est pas explicable que l'ADC de tous les métabolites augmente soudainement à 201 Hz puis diminue à nouveau à 252 Hz. Théoriquement, plus le temps de diffusion est court, moins la restriction pèse sur la valeur de l'ADC et donc plus sa valeur augmente, jusqu'à atteindre le coefficient de diffusion libre. Cette tendance est retrouvée en triant les acquisitions biaisées par un artefact de mouvement.

Les barres d'erreur restent importantes, surtout aux plus hautes fréquences à cause du plus petit nombre d'acquisitions.

## 7.6 Discussion

L'intérêt majeur du cosinus apodisé étiré est la possibilité de réduire le temps d'écho pour les expériences de gradients oscillants, tout en conservant une bonne pondération en diffusion. Plus de métabolites sont ainsi détectables et la contribution des macromolécules est quantifiable et permet d'être un marqueur endogène de la présence d'artefact de mouvement.

Les valeurs d'ADC rapportées pour le NAA, la tCr et la tCho sont plus basses que dans Marchadour et al. (2012). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence :

- Il est peu probable que des propriétés à très courte échelle (comme la viscosité du cytosol) soient différentes entre le rat et la souris, qui sont des espèces proches, mais la possibilité existe.
- L'estimation de l'ADC peut dépendre légèrement de la valeur de pondération en diffusion maximale utilisée, notamment parce que le contraste de diffusion est meilleur à  $b$  plus élevé et la mesure plus précise. L'écart entre les deux  $b_{\max}$  utilisés est faible ( $b_{\max, \text{Marchadour}}=1 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  vs  $b_{\max, \text{Ligneul}}=1.2 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ), mais peut contribuer à l'écart observé.
- Le contrôle de la qualité de chaque acquisition grâce au facteur des macromolécules permet de détecter les artefacts de mouvement. Il est possible qu'il y ait un léger biais lié à ces artefacts dans les mesures menées sur le rat et qu'il élève artificiellement la valeur des ADC mesurés. Les écarts types, plus importants dans l'étude de Marchadour et al. (2012), appuient également l'hypothèse de la présence d'artefacts de mouvement non détectés dans la précédente étude.

L'artefact de mouvement mis en évidence grâce aux macromolécules est particulièrement important à 150 Hz. Aucune fréquence physiologique n'est assez élevée pour expliquer ce phénomène. Pour une souris, le rythme cardiaque est autour de 10 Hz. Certains influx nerveux peuvent aller jusqu'à 600 Hz, mais ils sont désordonnés et irréguliers et ne devraient pas donner lieu à une résonance quelconque. Le rythme cérébral, correspondant à une oscillation électromagnétique cohérente d'un grand nombre de neurones dans le

cerveau et caractérisé par des signaux détectables sur les encéphaloelectro/magnétogrammes, varie à des fréquences comprises entre 4 Hz et 70 Hz.

Le caractère particulier de la mesure de diffusion par gradients oscillants par rapport aux gradients pulsés classiques semble plus susceptible d'induire d'un artefact. Avec les gradients pulsés, les potentielles vibrations induites par les gradients sont parfaitement décorréliées du temps de diffusion. Avec les gradients oscillants, les potentielles vibrations induites par le gradient ont la même fréquence que la fréquence de diffusion observée pour la mesure de l'ADC.

Il pourrait d'agir d'une sorte de résonance mécanique liée aux dimensions du crâne de la souris et aux propriétés élastiques du cerveau, ce qui pourrait expliquer la variabilité de la fréquence problématique. L'étude de Xu et al. (2012) s'intéresse à l'ADC de l'eau dans des tumeurs de souris pour étudier la réponse à la chimiothérapie. Un artefact de mouvement est également observé à 150 Hz, traduit par des déviations standard plus importantes à cette fréquence, sur souris et sur fantôme, mais le fantôme est alors placé sous la souris, d'où la différence avec notre étude sur fantôme. Cependant s'il s'agit juste d'une vibration liée au cerveau, cela ne devrait pas faire bouger le fantôme.

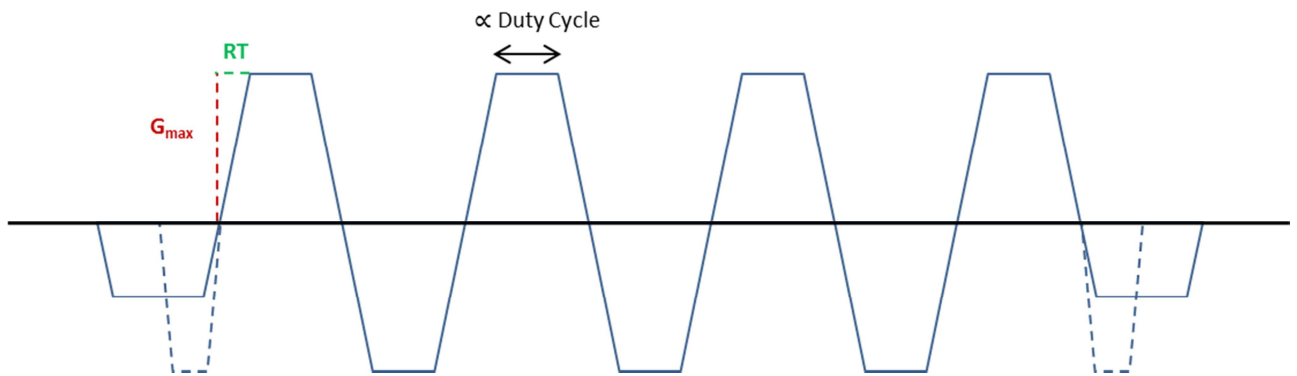
## **7.7 Perspectives : aller à des temps de diffusion encore plus courts**

La principale limite rencontrée pour l'étude de temps de diffusion encore plus courts que 1 ms est l'intensité maximale du gradient (et son temps de montée). La pondération en diffusion doit être suffisante afin de générer un contraste mesurable.

### **7.7.1 Nouveau gradient**

Le gradient a été conçu pour être un insert dans le scanner IRM Varian 7 T. Son intensité maximale ( $G_{\max}$ ) est de 1.5 T/m sur les trois axes, soit deux fois plus intense que le gradient intégré dans le scanner IRM Bruker 11.7 T. Une de ses faiblesses est son temps de montée (RT) : 250  $\mu$ s (100  $\mu$ s pour le Bruker). Ceci rend inutile l'utilisation du cosinus apodisé étiré, qui n'est intéressant que si l'on peut vraiment étirer les lobes, et donc avoir un temps de montée compétitif.

Pour cette étude très fondamentale, où il faut à la fois coupler un temps de diffusion très court et une pondération en diffusion acceptable, le trapèze oscillant reste la forme de gradient en théorie la plus optimale (Figure 7-10) pour maximiser b, même si elle cause une très légère dégradation des lobes secondaires sur la sélection de fréquence.



**Figure 7-10** : Forme du gradient trapézoïde utilisé avec le gradient à  $G_{\max}=1.5$  T/m et à  $RT=0.250$  ms.

Le temps de montée est limitant par rapport au temps de diffusion minimum que l'on peut atteindre. Sur un temps d'écho TE, un temps  $\delta$  est attribué aux gradients. Le nombre de périodes maximal est  $N_{\max} = \frac{\delta}{4t_m}$ , soit  $N_{\max}=30$ . Le meilleur compromis entre pondération en diffusion acceptable et temps d'écho raisonnable ( $TE=85$  ms,  $b=0.9$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ) permet d'aller jusqu'à  $N=20$  périodes avec une durée de gradients  $\delta=30$  ms. Le temps de diffusion est estimé à la limite de Mitra,  $t_{d,\text{Mitra}} = \frac{9T}{32*2N}$  soit  $t_{d,\text{min}}=0.21$  ms (à 667 Hz).

## 7.7.2 Méthodes

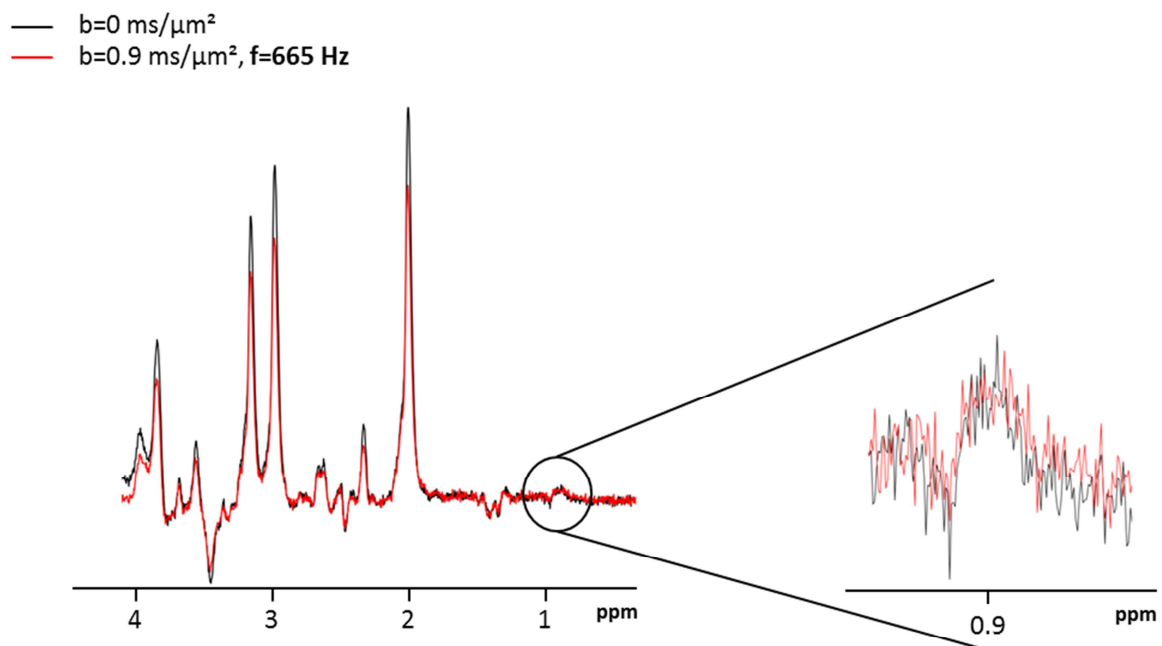
Pour obtenir un signal à bruit décent par rapport à l'étude précédente menée à 11.7 T avec l'antenne cryogénique sur souris, cette dernière a été réalisée sur des rats afin d'augmenter au maximum la taille du voxel dans le cerveau. Les femelles ont été privilégiées à cause de leur poids plus facilement contrôlable (<300 g). 16 rats ont été scannés au total, dans des conditions d'anesthésie et de suivi comparables à celles appliquées aux souris, à part pour le chauffage, réalisé à l'air chaud.

Le temps de relaxation transversale des métabolites est plus favorable à 7 T, mais le temps d'écho est fixé à  $TE=85$  ms et est ainsi choisi pour être du même ordre de grandeur que celui utilisé avec le gradient préclinique « normal » et pour avoir un signal de macromolécules détectable. Les formes de gradients sont générées sur Matlab insérées dans la LASER asymétrique pondérée en diffusion développée par Marchadour et al. (2012). Trois différents jeux de paramètres ont été acquis :  $b=0$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ;  $b=0.9$  ms/ $\mu\text{m}^2$   $N=5$  (156 Hz) ou  $N=20$  (667 Hz). Pour chaque jeu de paramètres, 25 séries de 32 répétitions ont été acquises en alternant les paramètres pour éviter de surchauffer le gradient fragile avec une longue acquisition au maximum de ses capacités. Le SNR (/NAA) résultant est de 118 pour un spectre sans pondération en diffusion et 100 pour un spectre acquis à  $N=20$  à  $b=0.9$  ms/ $\mu\text{m}^2$ . Les spectres sont acquis

individuellement pour permettre le rephasage individuel. Une fois sommés, l'eau résiduelle du spectre final est supprimée à l'aide d'une SVD.

Une autre faiblesse de ce gradient est la pauvre qualité du shim ainsi que sa variabilité. Alors que l'étude est réalisée à 7 T, le meilleur shim que l'on a pu obtenir est de 19 Hz et il est plutôt en général à 25 Hz, soit plus mauvais que sur le scanner IRM 11.7 T. Il a donc parfois été difficile de quantifier les spectres à l'aide de LCModel et la quantification des trois singulets principaux (NAA, tCr, tCho) par Matlab était souvent plus fiable.

Le signal de macromolécules résultant est faible par rapport à ce que l'on obtenait sur le 11.7 T (Figure 7-11). La quantification précise de ce signal est donc évidemment impossible et le facteur des macromolécules  $M$  défini en §7.5 (Equation 7-7) n'est pas utilisable comme outil de tri des mesures corrompues ou pas par un artefact de mouvement. Seules quelques acquisitions (2 à  $N=5$  et aucune à  $N=20$ ) présentant un biais évident, caractérisé par une différence visuelle sur le signal des macromolécules entre les spectres avec et sans diffusion (pas toujours évident non plus, car le spectre à  $b=0.9 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  présente parfois un signal de macromolécules plus important qu'à  $b=0$ ) ou par un ADC des métabolites sortant complètement de la moyenne, ont été effectivement supprimées de la moyenne finale.



**Figure 7-11** : Signal de macromolécules sur un spectre avec (rouge) et sans (noir) pondération en diffusion acquis chez le rat ( $TE=85 \text{ ms}$ ).



### Autres faiblesses du gradient

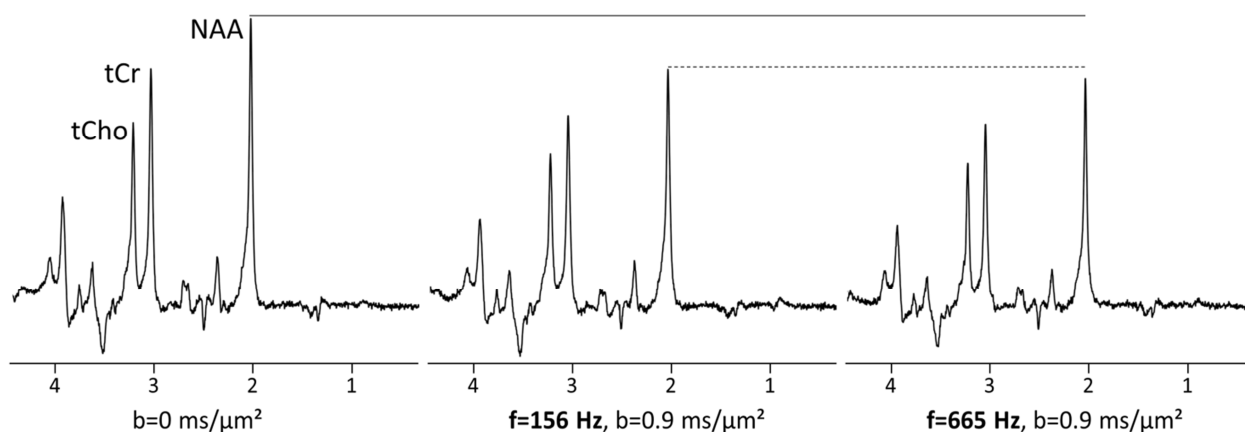
La calibration des trois axes n'est pas parfaitement équivalente et lorsque le gradient est poussé à son amplitude maximale (pour les mesures à 667 Hz), le coefficient de diffusion libre de l'eau mesuré est un peu plus faible que celui mesuré à 156 Hz, où les gradients sont moins intenses. Nous avons donc corrigé les ADC de la plus haute fréquence (667 Hz) avec un facteur  $f_{\text{corr}} = \frac{D_{\text{eau}}(667 \text{ Hz})}{D_{\text{eau}}(156 \text{ Hz})}$ . C'est le ratio du coefficient de diffusion de l'eau mesuré à la plus haute fréquence et du coefficient de diffusion de l'eau mesuré à basse fréquence. Pour cette étude, nous avons mesuré  $f_{\text{corr}} = 0.87$ .

Le duty cycle est assez mauvais (possibilité pour le gradient de rester longtemps à une forte intensité notamment) ce qui nous a empêché de faire des mesures à hautes valeurs de b à N=5 qui auraient été très intéressantes.

Enfin, l'association du gradient utilisé au maximum de son intensité à N=20 ( $b=0.9 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; sans problème de duty cycle) et de l'antenne surfacique semble causer un échauffement non contrôlé auquel nous ne sommes pas sensible avec l'antenne volumique.

### 7.7.3 Résultats

Comme pour l'étude à 11.7 T à temps très court, l'ADC continue d'augmenter avec la fréquence. Le signal à bruit des spectres est bon (Figure 7-12), mais le shim est de qualité très moyenne.



**Figure 7-12** : Echantillon de spectres représentatif de l'atténuation du signal à chaque fréquence. Les spectres ont été acquis pendant une même session.

Les ADC des métabolites NAA, tCr et tCho à 156 Hz (N=5) et à 667 Hz (N=20) sont reportés dans la table 7-3.

Table 7-3 : Coefficients de diffusion apparents du NAA, de la tCr et des tCho mesurés dans le cerveau de rat à 156 Hz et 667 Hz.

	<b>NAA</b>	<b>tCr</b>	<b>tCho</b>
<b>ADC<sub>156 Hz</sub></b> ( $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ )	$0.19 \pm 0.07$	$0.22 \pm 0.07$	$0.20 \pm 0.06$
<b>ADC<sub>667 Hz/f<sub>corr</sub></sub></b> ( $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ )	$0.26 \pm 0.07$	$0.30 \pm 0.07$	$0.26 \pm 0.07$

Les écarts types sont importants, les mesures sont bruitées. La valeur relativement faible de la pondération en diffusion utilisée ( $0.9 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) produit un contraste de diffusion moins bon que dans la partie précédente. Ceci peut en partie expliquer la variabilité observée, mais l'instabilité du gradient en est probablement la première cause.

Au-delà des quelques difficultés expérimentales dues à la fragilité du gradient, ces résultats n'en restent pas moins pionniers dans l'exploration des temps de diffusion ultra-courts. De ce qu'on connaît de la littérature, c'est a priori la première fois que des ADC sont mesurés *in vivo* à une fréquence aussi élevée (667 Hz). La faible diffusivité des métabolites rendent ces mesures d'autant plus intéressantes qu'elles sont le reflet de la diffusion à de toutes petites échelles spatiales ( $\sim 400 \text{ nm}$ ). Il faudrait pouvoir acquérir plus de points à différentes fréquences avec le supergradient pour ne pas avoir à mélanger ces données aux précédentes.

## 7.8 Conclusion et publications associées

Le cosinus apodisé étiré décrit en §7.2 permet d'améliorer la pondération en diffusion de plus de 50% ou de réduire significativement le temps d'écho, permettant ainsi de détecter plus de métabolites (même ceux présentant un couplage scalaire, comme le myo-inositol) et de détecter le signal des macromolécules. Les macromolécules sont proposées comme un contrôle endogène très efficace pour détecter les artefacts de mouvements rapportés avec les gradients oscillants.

Avec un gradient plus intense, il est possible d'atteindre des temps de diffusion *in vivo* de l'ordre de 0.21 ms, dont nous présentons les résultats préliminaires dans les perspectives (§7.7). L'objectif de la mesure de la diffusion à temps ultra-courts est d'atteindre directement, sans modèle, le coefficient de diffusion intracellulaire libre des métabolites principaux. L'accès à la viscosité du cytosol, variable en conditions pathologiques, peut être d'intérêt, mais ce type de mesure est très bruité et n'est pas applicable en clinique pour le moment. L'intérêt majeur, plus fondamental, serait d'avoir une valeur de  $D_{\text{intra}}$  fiable pour guider les modèles s'ajustant aux données acquises dans le chapitre 6 (par exemple) et qui permettent de déterminer les paramètres d'intérêt de la microstructure.

L'ensemble des résultats du chapitre 7 est justement discuté à l'aide de la modélisation dans le chapitre 8 (§8.5) : d'une part avec un modèle de cylindres infinis, pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux de l'étude de Marchadour et al. (2012) et d'autre part avec un modèle proposé par Novikov et Kiselev (2011), valable dans la limite de Mitra.

## **Publications associées**

### *Article scientifique*

Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and “short”-echo-time diffusion-weighted MRS. *NMR in Biomedicine*, 30(1), 1–10. doi:10.1002/nbm.3671

Note: La fréquence la plus basse indiquée dans cet article est à 35 Hz, au lieu de 49 Hz. Il s'agit d'une erreur de ma part. Cependant, cela ne changeant rien aux interprétations (ni même à la modélisation présentée en §8.5.1), nous avons laissé l'article en l'état.

### *Communication orale*

Ligneul, C., Najac, C., Flament, J., & Valette, J. (2015). Probing metabolite diffusion at ultra-short diffusion times in the mouse brain using optimized oscillating gradients and a “short” echo time strategy. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 23* (Vol. 32, p. 0616).

### *Power Poster*

Ligneul, C., Palombo, M., Flament, J., & Valette, J. (2017). Approaching free intracellular diffusion by diffusion-weighted MRS at ultra-short time scales : initial results in the rodent brain using a 1.5 T/m gradient. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 25* (Vol. 71, p. 1082).

## CHAPITRE 8

### Exploitation des mesures de diffusion par la modélisation

---

Les cellules du cerveau, notamment les neurones et les astrocytes, sont composées d'un corps cellulaire, et de prolongements fibreux plus ou moins longs (axones et dendrites pour les neurones, processus astrocytaires pour les astrocytes, cf chapitre 1). Ces fibres sont elles-mêmes constituées de ramifications et prolongements secondaires et de structures secondaires de petite taille (épines dendritiques et feuillettes astrocytaires) qui complexifient davantage cet ensemble. Julien Valette et Marco Palombo ont développé des modèles tenant en partie compte de cette complexité. Pour modéliser extrêmement simplement cet environnement cellulaire, les somas peuvent être modélisés par des sphères et les prolongements fibreux par des cylindres.

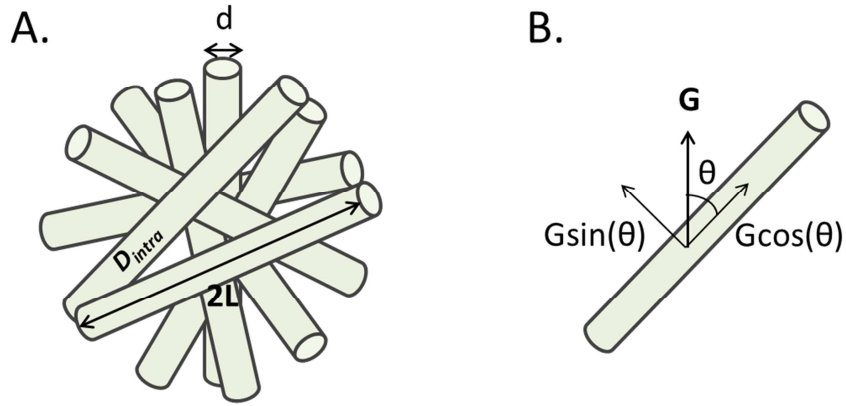
Ce chapitre montre comment nos données peuvent être utilisées pour quantifier ces variables de la morphologie cellulaire qui sont susceptibles de varier en conditions pathologiques (cf partie 3).

#### 8.1 Le modèle des cylindres infinis et le modèle des sphères

##### 8.1.1 Modèle des cylindres infinis, dit des « neurites »

Dans la matière grise et dans les grands voxels considérés dans les études présentées dans ce manuscrit en général, les fibres sont orientées de manière aléatoire. Le gradient de diffusion  $\mathbf{G}$  est appliqué selon une direction faisant un angle  $\theta$  avec un cylindre donné et  $g_{\perp} = G\cos(\theta)$  et  $g_{\parallel} = G\sin(\theta)$  (Figure 8-1). Le coefficient de diffusion intracellulaire libre des métabolites peut alors se décomposer en  $D_{\perp}$ , coefficient de diffusion transversal et  $D_{\parallel}$ , coefficient de diffusion longitudinal.

A des temps de diffusion intermédiaires, le métabolite parcourt quelques microns et n'a le temps d'être sensible qu'à la restriction transversale. C'est comme si le cylindre était infini. La diffusion longitudinale  $D_{\parallel}$  peut alors être considérée comme libre, donc gaussienne. A temps de diffusion longs, comme les cylindres sont orientés isotropiquement, l'ADC ne reflète plus que  $D_{\parallel} = \frac{D_{\text{intra}}}{3}$ , car la diffusion transversale est nulle. L'intracellularité des métabolites permet également de considérer ces cylindres comme imperméables.



**Figure 8-1** : Représentation du modèle des neurites. (A) Cylindres orientés aléatoirement, de longueur  $2L$  et de diamètre  $d$ .  $D_{intra}$  est le coefficient de diffusion intracellulaire libre des métabolites. (B) Le gradient est appliqué dans une direction  $\theta$  par rapport à l'orientation  $d$  d'un cylindre.

Dans l'approximation des gradients courts (SGP), l'atténuation de l'écho s'écrit alors (Linse et Söderman 1995):

$$E(\delta, \Delta, g) = \left\{ \frac{[2 \times J_1(\gamma g_{\perp} \delta R)]^2}{(\gamma g_{\perp} \delta R)^2} + 8 \times (\gamma g_{\perp} \delta R)^2 \times A_{nm} \right\} \times e^{\gamma^2 \delta^2 g_{\parallel}^2 \Delta R_{intra}} \quad (8-1)$$

$$\text{Avec } A_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ \frac{1}{1 + \delta_{n0}} \times [J'_n(\gamma g_{\perp} \delta R)]^2 \times \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2) \times [\alpha_{nm}^2 - (\gamma g_{\perp} \delta R)^2]^2} \times e^{-\frac{\alpha_{nm}^2 \Delta R_{intra}}{R^2}} \right\}$$

Dans cette équation,  $J_n$  est la fonction de Bessel d'ordre  $n$  et  $\alpha_{nm}$  est la  $m$ -ième racine positive de l'équation de Bessel  $J'_n = 0$ .  $\delta_{n0}$  est le symbole de Kronecker.  $R=d/2$  est le rayon du cylindre.

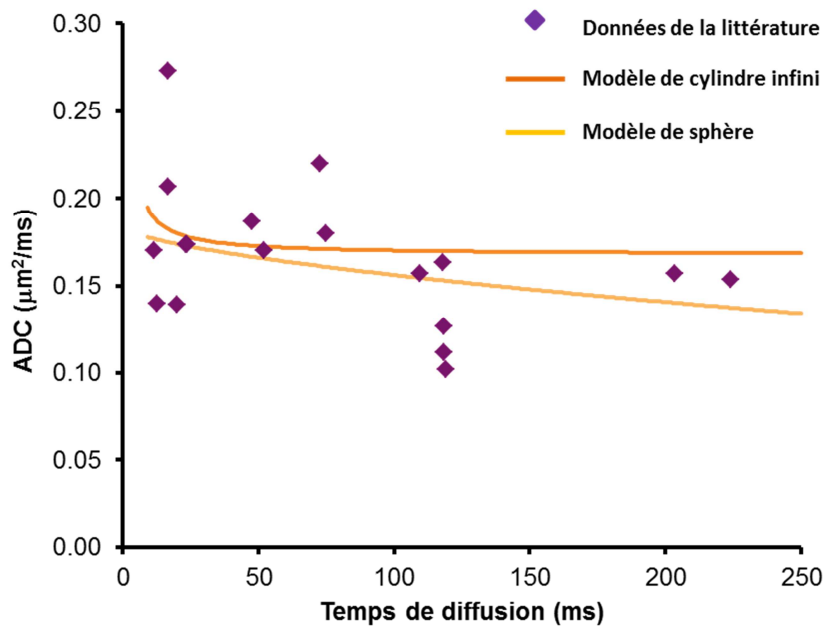
Ce modèle est valable à toutes les valeurs de pondération en diffusion.

### 8.1.2 Le modèle des sphères imperméables

Dans ce modèle, la diffusion est restreinte selon les 3 directions, pour mimer une diffusion dans les corps cellulaires. Quand le temps de diffusion est très long ( $\Delta \rightarrow \infty$ ), l'ADC tend vers 0 car le déplacement de la molécule est borné dans toutes les directions. Par une expression analogue à l'équation 8-1 ci-dessus, il est possible de décrire l'atténuation à l'écho pour la diffusion d'une molécule dans une sphère de rayon  $R$  (Linse et Söderman, 1995).

## 8.2 Les métabolites diffusent principalement dans les fibres

L'intervalle de temps de diffusion exploré en spectroscopie de diffusion avant les études pionnières de Marchadour et al. (2012) et Najac et al. (2014&2016) allait de 11.7 ms (Duong et al., 2001) à 245 ms (Branzoli et al., 2013) (Figure 8-2).

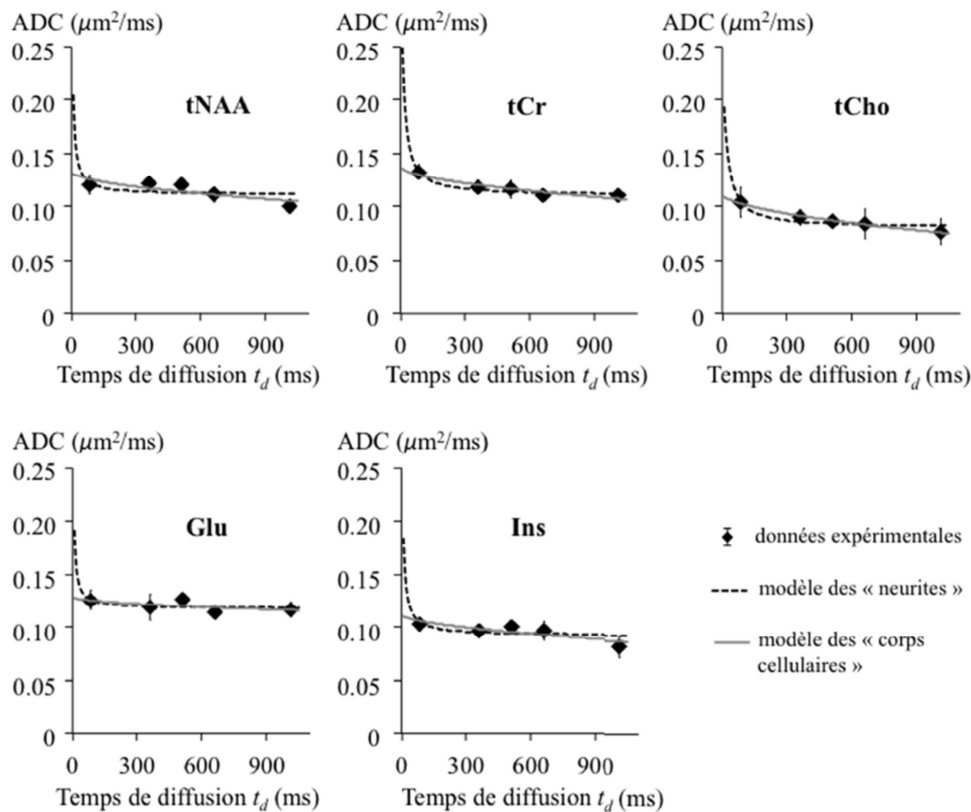


**Figure 8-2** : ADC des métabolites mesurés dans la littérature (diamants violets). Les courbes représentent les ajustements à ces données que génèrent les modèles de cylindres infinis (orange) ou de sphères de diamètre 80 µm (jaune). Adapté de Marchadour et al. (2012).

Cet intervalle de temps de diffusion est trop petit pour pouvoir conclure quant à la plus grande pertinence d'un modèle sur l'autre. Les distances de diffusion explorées sont autour de la dizaine de microns et les expériences donnent des ADC variables, liées aux conditions d'acquisition différentes pour les différentes mesures.

En étudiant la diffusion des métabolites dans un grand voxel (5.8 ml) placé dans le cerveau de macaque pour des temps de diffusion allant de 86 ms à 1011 ms, l'étude de Najac et al. (2014) permet de statuer sur la géométrie préférentielle de l'environnement dans lequel diffusent les métabolites.

Les ADC du NAA, du Glu, de la tCr, des tCho et de l'Ins sont mesurés à chaque temps de diffusion avec une séquence STEAM pondérée en diffusion (cf §4.4) et l'évolution est plutôt stable (Figure 8-3).



**Figure 8-3** : ADC en fonction du temps de diffusion pour le NAA, le Glu, la tCr, les tCho et l’Ins dans le cerveau de macaque. Les courbes correspondent aux meilleurs ajustements du modèle des cylindres et du modèle de sphères.

Il est possible d’ajuster les données avec le modèle des sphères et le modèle des cylindres. Cependant le modèle des sphères donne des estimations du  $D_{\text{intra}}$  beaucoup trop faible (0.11-0.14  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ), inférieures à la mesure des ADC à  $t_d$  plus court (cf chapitre 7 et Marchadour et al., 2012), ce qui n’est pas possible. De plus l’estimation du diamètre des sphères est beaucoup trop importante ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ) et lorsque ce paramètre est contraint à des valeurs plus réalistes, le modèle des sphères ne s’ajuste plus aux données et l’ADC simulé temps vers 0 très rapidement.

Le modèle des neurites donne une estimation des  $D_{\text{intra}}$  (0.26-0.41  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) et de diamètre de fibres (4-7  $\mu\text{m}$ ) beaucoup plus raisonnables.

Quelques études ont montré que la fraction volumique de fibres ( $\sim 65\%$ ) était beaucoup plus importante que celle des corps cellulaires dans le cerveau. Ces études mesurent la fraction volumique de corps cellulaires à 15%, soit 65% de fibres en estimant la contribution de l’espace extracellulaire à 20% du volume total (chez le babouin en histologie, Chklovskii et al., 2002 ; chez la souris en microscopie

électronique, Sherwood et Basser , 2004) ou bien directement la fraction volumique de fibres neuronales en imagerie de diffusion (Jespersen et al., 2007).

Les métabolites intracellulaires dont nous mesurons la diffusion sont majoritairement dans les axones, dendrites et processus astrocytaires.

### **8.3 Modélisation de l'atténuation du signal aux hautes valeurs de pondération en diffusion à $t_d=63.2$ ms**

Puisque les données présentées en §6.3 n'exhibent pas ou peu de dépendance à la relaxation, un modèle géométrique peut être utilisé pour estimer des grandeurs clés telles que le diamètre des fibres dans lesquelles les métabolites diffusent ou le  $D_{\text{intra}}$ . En exploitant les données acquises à  $T_M=60$  ms où l'échelle de restriction appréhendée convient bien, la modélisation de l'atténuation du signal du NAA et du glutamate peuvent apporter une estimation du diamètre des axones et celle des tCho et Ins, une estimation des processus astrocytaires.

Le modèle des cylindres infinis orientés isotropiquement, décrit plus haut, est adapté à ce temps de diffusion, où les métabolites parcourent des distances de l'ordre de quelques microns, loin de la longueur des fibres.

L'ajustement du modèle aux données moyennées a été effectué à l'aide d'une régression des moindres carrés non linéaire en utilisant la fonction lsqcurvefit de Matlab. L'erreur sur cet ajustement a été évaluée par une approche de Monte-Carlo ( $n=2500$ ). Le principe consiste à calculer la déviation standard entre le meilleur ajustement et les données, puis à générer un nouveau jeu de données en ajoutant un bruit aléatoire au meilleur ajustement à partir de la déviation standard calculée auparavant, et enfin à recalculer le meilleur ajustement pour ce nouveau jeu de données synthétique. Cela est répété  $n$  fois et permet d'évaluer la qualité de l'ajustement aux données dépendamment du modèle. Les résultats pour le NAA, le Glu, la tCr, la Tau, les tCho et l'Ins sont rassemblés dans la Table 8-1.

La modélisation du NAA pour l'atténuation du signal aux hautes pondérations en diffusion est connue pour donner un rayon nul (Assaf et Cohen, 1999&2000 ; Kroenke et al., 2004). La sensibilité au TE de cette atténuation peut en partie expliquer le phénomène : à des TE courts, la sensibilité à des populations très restreintes de NAA, de  $T_2$  plus court, est accrue.

Table 8-1 : Paramètres estimés par le modèle des cylindres infinis orientés isotropiquement avec une analyse de Monte-Carlo.



<b>Métabolite</b>	<b>D<sub>intra</sub> (μm<sup>2</sup>/ms)</b>	<b>Rayon (μm)</b>
<i>NAA</i>	0.332 ± 0.011	0.024 ± 0.083
<i>Glutamate</i>	0.439 ± 0.018	0.76 ± 0.16
<i>Créatine</i>	0.369 ± 0.016	1.429 ± 0.087
<i>Taurine</i>	0.416 ± 0.018	1.15 ± 0.10
<i>Choline</i>	0.311 ± 0.015	1.260 ± 0.095
<i>Myo-Inositol</i>	0.328 ± 0.015	1.554 ± 0.080

Le NAA étant synthétisé dans les mitochondries, il pourrait y être particulièrement présent. Les mitochondries représentent 5-10% du volume du cytosol. Pour modéliser le NAA à TE court, Marco Palombo a d'abord extrait le D<sub>intra</sub> et le rayon grâce aux mesures de diffusion effectuées à TE=73.4 ms, moins biaisées par les populations de NAA aux T<sub>2</sub> courts. Les paramètres estimés sont D<sub>intra</sub>=0.335 ± 0.021 μm<sup>2</sup>/ms et R=0.62 ± 0.12 μm. Le rayon estimé est proche de celui estimé pour le glutamate, ce qui est en accord avec la commune compartimentation neuronale du NAA et du Glu.

Puis l'atténuation du signal à TE court est modélisée avec deux compartiments : des cylindres, dont les paramètres (D<sub>intra</sub> et le rayon) sont fixés par l'analyse à TE long, et des sphères (Linse et Söderman, 1995). La population de sphères extraite représente une fraction très faible de l'ensemble (~2%) et son diamètre moyen est autour de 0.02 μm. Il est raisonnable de considérer que cette population du NAA peut être représentée par une simple population fixe, ce qui permet de simplifier le modèle (équation 8-2) et d'extraire directement le rayon et le D<sub>intra</sub>, quel que soit le temps d'écho de la mesure.

$$E_{\text{tot}}(q, t_d) = f + (1 - f)E_{\text{cyl}}(q, t_d) \quad (8-2)$$

E<sub>cyl</sub> est l'atténuation du signal en fonction de q (de façon équivalente en fonction de b) à t<sub>d</sub> fixé, décrite par le modèle des cylindres infinis orientés isotropiquement décrit plus haut. f est la fraction représentative de la population fixe.

Appliqué à l'atténuation du signal jusqu'à b=60 ms/μm<sup>2</sup> du NAA à TE=33.4 ms et TM=60ms, ce modèle simplifié donne D<sub>intra</sub>=0.374 ± 0.023 μm<sup>2</sup>/ms et R=0.93 ± 0.22 μm, avec f=8 ± 3%, ce qui est très cohérent avec le rayon obtenu pour le glutamate, ainsi qu'avec la fraction volumique mitochondriale, même si cette population fixe peut venir d'autre part, comme la myéline par exemple.

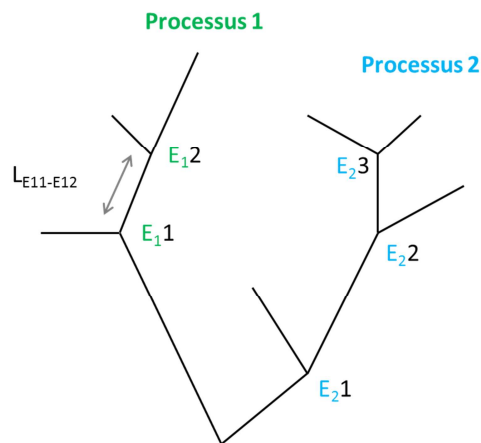
L'article de Palombo et al. publié en 2016 dans *Magnetic Resonance in Medicine* décrit précisément la démarche et les résultats et discute de l'ensemble.

#### 8.4 Modélisation de l'atténuation du signal aux très longs temps de diffusion, b fixé.

Une première approche pour modéliser la diffusion à temps longs est d'utiliser un modèle de cylindres orientés isotropiquement, mais de longueur finie pour lequel il existe une expression analytique (approche décrite dans la thèse de Chloé Najac, 2014).

Cependant à temps longs, le métabolite qui diffuse est confronté aux embranchements et processus secondaires. A  $t_d=2$  s, la longueur de diffusion caractéristique est d'environ  $20 \mu\text{m}$  si la diffusion est considérée unidirectionnelle avec un  $\text{ADC} \approx 0.1 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ . C'est court par rapport aux longueurs caractéristiques des processus neuronaux et astrocytaires, mais c'est suffisamment long pour appréhender en partie la complexité de la structure.

Le modèle développé par Marco Palombo est un modèle de cylindres à une dimension, avec embranchements (Figure 8-4). La molécule qui diffuse reste au sein d'une même cellule pendant tout le temps de diffusion (cylindres imperméables), ce qui est plausible, considérant l'intracellularité des métabolites et la vitesse de leurs échanges. Un grand nombre de cellules synthétiques est généré selon une distribution de trois paramètres :  $N_{\text{proc}}$ , le nombre le processus,  $N_{\text{branch}}$ , le nombre d'embranchements et  $L_{\text{segment}}$ , la longueur d'un segment entre deux embranchements. Les déviations standard correspondant à ces distributions sont  $SD_{N_{\text{proc}}}$ ,  $SD_{N_{\text{branch}}}$  et  $SD_{L_{\text{segment}}}$ .  $N_{\text{proc}}$  n'est pas ajusté, car il n'a aucune influence sur l'ajustement des autres paramètres aux données.



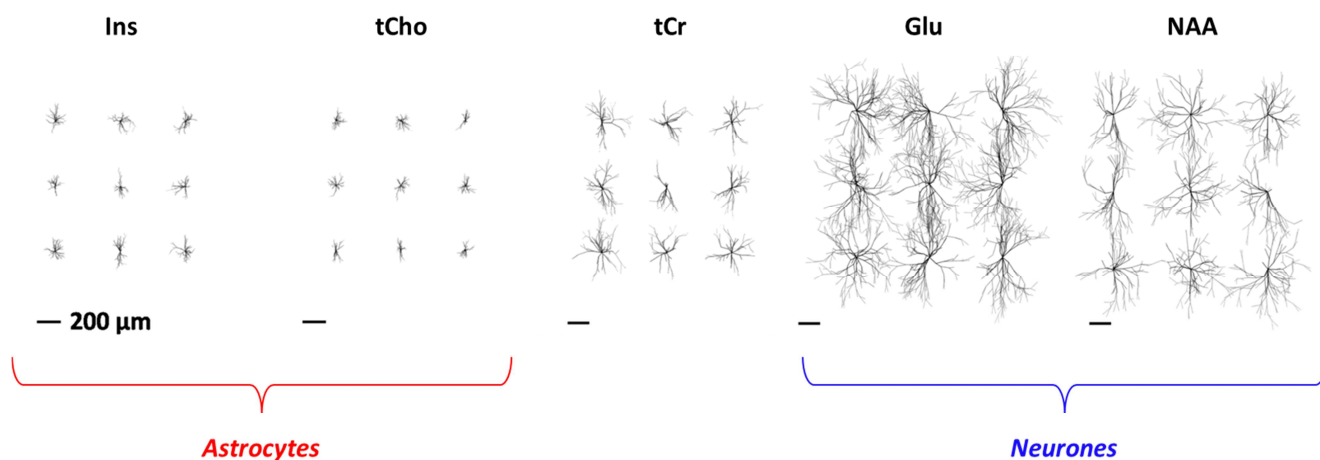
**Figure 8-4** : exemple de cellule synthétique générée selon 3 paramètres ( $N_{\text{proc}}$ , le nombre le processus ;  $N_{\text{branch}}$ , le nombre d'embranchements  $E_i$  d'un processus  $i$  ;  $L_{\text{segment}}$ , la longueur d'un segment entre deux embranchements).

La diffusion d'un nombre  $n$  de molécules est simulée à l'intérieur de ces cellules synthétiques. Puis ces courbes de diffusion simulées sont comparées aux courbes de diffusion expérimentales. Le meilleur ajustement émerge grâce à un algorithme de Monte Carlo et les distributions expérimentales de chaque paramètre pour chaque métabolite sont extraites (Table 8-2).

**Table 8-2** : Distribution des paramètres provenant du meilleur ajustement déterminé par une approche de Monte-Carlo sur les courbes de diffusion expérimentales.

Métabolite	$N_{\text{branch}} (\mu\text{m})$	$SD_{N_{\text{branch}}} (\mu\text{m})$	$L_{\text{segment}} (\mu\text{m})$	$SD_{L_{\text{segment}}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{intra}} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$
<i>NAA</i>	$4.0 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.2$	$60.4 \pm 0.3$	$4.8 \pm 0.6$	$0.306 \pm 0.001$
<i>Glutamate</i>	$4.5 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.4$	$60.5 \pm 0.2$	$8.1 \pm 0.7$	$0.421 \pm 0.003$
<i>Créatine</i>	$3.4 \pm 0.2$	$2.4 \pm 0.1$	$45.4 \pm 0.3$	$17.8 \pm 0.9$	$0.404 \pm 0.002$
<i>Taurine</i>	$3.4 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.6$	$45.9 \pm 0.4$	$15.0 \pm 0.9$	$0.440 \pm 0.003$
<i>Choline</i>	$2.6 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$	$16.3 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.3$	$0.344 \pm 0.003$
<i>Myo-Inositol</i>	$3.3 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.2$	$23.8 \pm 0.3$	$11.1 \pm 1.0$	$0.386 \pm 0.003$

Cela permet de construire un tissu synthétique de cellules types dans lesquelles les métabolites diffusent (Figure 8-5). De ces mesures ressort assez clairement la compartimentation spécifique des métabolites, comme nous l'avons déjà observé sur les données brutes. Si cela ne nous permet pas de conclure fermement, cela nous conforte encore davantage dans l'idée que le NAA et le glutamate diffusent dans le même compartiment, manifestement pourvu de longs processus, correspondant très probablement au compartiment neuronal. La conclusion est similaire pour la compartimentation commune du myo-inositol et de la choline, qui diffusent dans des compartiments de petite taille, typiquement astrocytaire.



**Figure 8-5**: Représentation de cellules virtuelles types pour chaque métabolite (données de diffusion

présentées en §6.4), issues des distributions de paramètres  $N_{proc}$ ,  $N_{branch}$  et  $L_{segment}$  (et leur déviations standard), provenant du meilleur ajustement déterminé par une approche de Monte-Carlo.

Les cellules « virtuelles » obtenues sont comparables avec l'observation directe de la morphologie des cellules réalisée *ex vivo*, car certains outils d'analyse utilisés en microscopie (après un marquage histologique par exemple) s'appliquent très bien aux cellules virtuelles générées. L'analyse de Sholl, usuellement utilisée pour caractériser la complexité et l'étendue spatiale d'un astrocyte, en est un exemple. Pour obtenir une idée de la longueur moyenne des processus des cellules présentes dans le grand voxel d'acquisition, il suffit de multiplier  $N_{branch}$  par  $L_{segment}$ .

## 8.5 Modélisation à des temps de diffusion très courts

### 8.5.1 Cylindres infinis

A des temps de diffusion très courts, l'utilisation des gradients oscillants est incompatible avec l'approximation des gradients courts. Le modèle décrit en 8-a n'est donc plus directement utilisable. Stepisnik (1993) utilise la fonction d'autocorrélation des vitesses dans le domaine fréquentiel, sous condition d'approximation gaussienne de la distribution de la phase (petites valeurs de  $b$ ), afin de calculer le tenseur de diffusion apparent (en fonction de la fréquence) pour une diffusion restreinte :

$$D(\omega) = \sum_k B_k \frac{a_k D_{intra} \omega^2}{a_k^2 D_{intra}^2 + \omega^2} \quad (8-3)$$

Avec  $B_k$  et  $a_k$  variables selon la géométrie de l'environnement restreignant la diffusion. Dans le cas de cylindres infinis orientés isotropiquement :

$B_k = \frac{2 \left(\frac{R}{\mu_k}\right)^2}{\mu_k^2 - 1}$  et  $a_k = \left(\frac{\mu_k}{R}\right)^2$ ,  $\mu_k$  étant les solutions de  $J_1'(\mu) = 0$ ,  $J_1$  étant la fonction de Bessel de première espèce.

L'étude de Marchadour et al. (2012) compare le modèle de cylindres infinis et le modèle de pores sphériques interconnectées. Les deux modèles s'ajustent aussi bien aux données et donnent des valeurs de  $D_{intra}$  et rayon d'ordre de grandeur raisonnable. L'intervalle de  $t_d$  (ou de fréquences) étudié est trop court pour qu'un modèle l'emporte sur l'autre. Cependant, nous savons depuis l'étude de Najac et al. (2014) que les métabolites diffusent principalement dans les fibres. C'est donc le modèle de cylindres infinis que nous avons utilisé pour extraire le  $D_{intra}$  des métabolites et le rayon des fibres dans lesquelles ils diffusent (Table 8-3), pour modéliser les données présentées en §7.5.

Table 8-3 : Paramètres estimés par le modèle des cylindres infinis orientés isotropiquement par une approche de Monte-Carlo (n=1000) à partir des ADC en fonction de la fréquence.

<b>Métabolite</b>	<b>D<sub>intra</sub> (μm<sup>2</sup>/ms)</b>	<b>Rayon (μm)</b>
<i>NAA</i>	0.50 ± 0.02	0.78 ± 0.03
<i>Créatine</i>	0.65 ± 0.04	0.79 ± 0.05
<i>Taurine</i>	0.88 ± 0.15	1.04 ± 0.45
<i>Choline</i>	0.54 ± 0.06	0.82 ± 0.09
<i>Myo-Inositol</i>	0.62 ± 0.01	0.82 ± 0.01

Les paramètres extraits pour chaque métabolite donnent des valeurs très comparables aux valeurs obtenues par Marchadour et al. (2012). Les rayons issus de cette modélisation sont d'ordre de grandeur raisonnable.

### 8.5.2 Limite de Mitra

Etudier la diffusion à des temps très courts permet de se rapprocher de la mesure expérimentale du D<sub>intra</sub>. Utiliser des a priori géométriques pour extraire ce D<sub>intra</sub> peut être une source de biais supplémentaire, l'idéal est d'extraire directement, sans a priori de structure, les S/V et les coefficients de diffusion intracellulaires libres, ce qui est possible lorsque le régime de Mitra est atteint. Nous n'avons pas initialement extrait les ratios surface sur volume de ces mesures, mais en combinant les mesures présentées en §7.5 (souris) et §7.7 (rat), nous avons extrait les D<sub>intra</sub> et S/V d'après la formule de Novikov et Kiselev (2011).

Dans l'approximation des temps de diffusion très courts, il est possible de modéliser l'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion grâce à la formule suivante, établie par Mitra et al. (1992) :

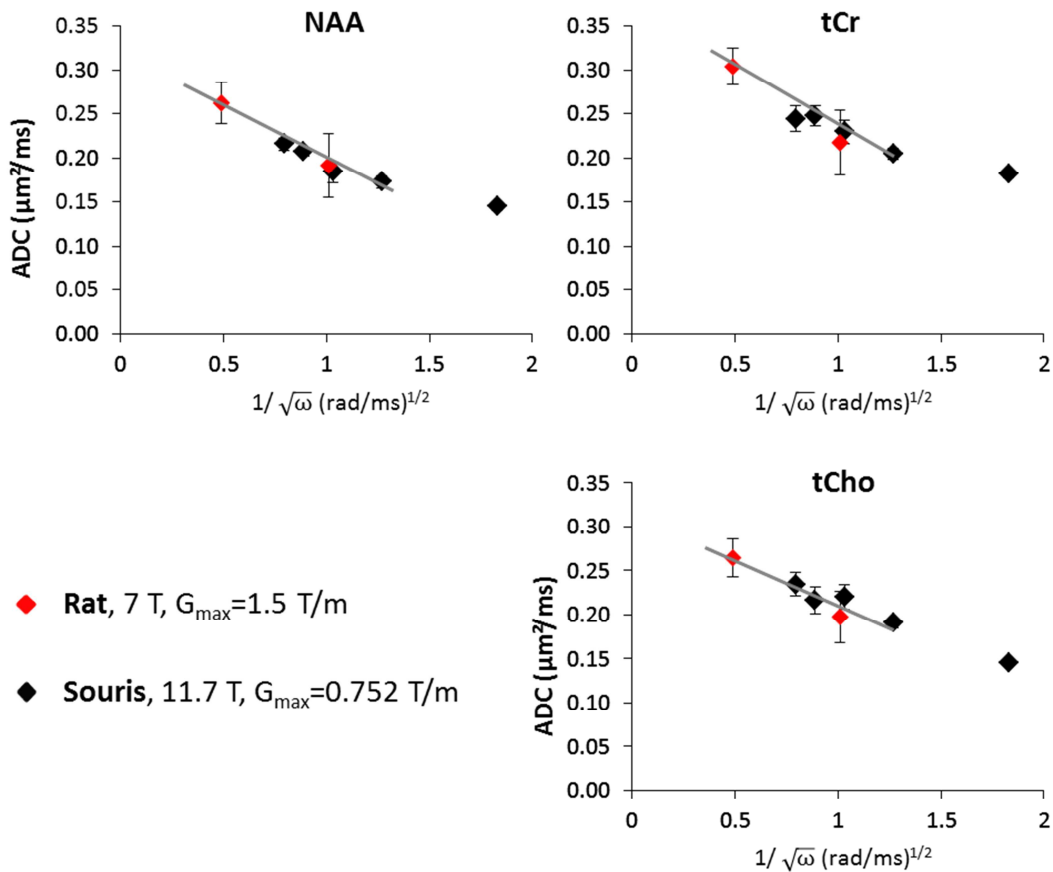
$$\frac{D(t)}{D_0} = 1 - \frac{4}{3d\sqrt{\pi}}(D_0t)^{\frac{1}{2}}\frac{S}{V} + O(D_0t) \quad (8-4)$$

D<sub>0</sub> correspond au coefficient de diffusion libre (intracellulaire dans le cas de la diffusion des métabolites). Le rapport surface sur volume S/V décrit l'environnement géométrique exploré par le marcheur aléatoire qu'est la molécule qui diffuse. d est le nombre de dimensions. Dans le cadre du formalisme fréquentiel imposé par les gradients oscillants, il n'est pas correct de remplacer directement t par 1/ω. Le facteur  $\frac{4}{3d\sqrt{\pi}}$  a notamment été établi dans le cadre des expériences à gradients pulsés. En s'appuyant sur l'équivalence établie entre les gradients oscillants et les gradients pulsés (Novikov et al., 2010&2011), Novikov et Kiselev (2011) établissent la relation entre le coefficient de diffusion en fonction de la fréquence :

$$\text{Re}(D(\omega)) = D_0 \left( 1 - \frac{1}{d\sqrt{2}} \frac{S}{V} \sqrt{\frac{D_0}{\omega}} \right) \quad (8-5)$$

Le temps de diffusion effectif est alors estimé à  $t_{\text{d,eff}} = \frac{9\pi}{32\omega}$ , et  $\omega = 2\pi f$ . Avec  $N=20$  et  $\delta=30$  ms,  $f=667$  Hz, cela donne un temps de diffusion effectif  $t_{\text{d,eff}}=0.21$  ms. La longueur de diffusion caractéristique est donc  $\sqrt{2t_{\text{d,eff}}D} \sim 400$  nm le long de  $\mathbf{G}_{\text{diff}}$ , ce qui est très court. Le bénéfice de la faible diffusivité des métabolites par rapport à l'eau ( $\sim 1 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  in vivo) permet de gagner un facteur 2 sur cette longueur.

Les ADC reportés en §7.5 et en §7.7 se marient assez bien (Figure 8-6). Ce n'est pas particulièrement surprenant car il n'y a pas de raison majeure que la viscosité intracellulaire varie entre des espèces aussi proches que le rat et la souris. Cette concaténation des données est évidemment à prendre avec des pincettes, au vu des différences expérimentales (espèce, scanner, TE).



**Figure 8-6 :** ADC en fonction de l'inverse de la racine carrée de la fréquence pour le NAA, la tCr et les tCho. Les diamants noirs correspondent aux données acquises en §7.5. Les diamants rouges correspondent

aux données acquises en §7.7. La ligne grise correspond à la régression linéaire de laquelle on extrait les  $S/V$  et  $D_0$  d'après la formule 8-2.

Un ajustement linéaire est réalisé sur l'ADC en fonction de  $1/\sqrt{\omega}$  pour extraire les ratios  $S/V$  et le  $D_0$  sans faire d'a priori sur la géométrie du système, selon l'équation 8-5. Le point à 50 Hz est exclu car il est clairement hors de la limite des temps de diffusion courts. En faisant l'hypothèse d'une géométrie cylindrique,  $S/V=2/R$  et le rayon des fibres dans lesquelles les métabolites diffusent peuvent être estimés. Les résultats sont résumés dans la table 8-4.

Table 8-4 : Coefficient de diffusion libre intracellulaire  $D_0$ ,  $S/V$  et rayon extraits de l'ajustement linéaire réalisé sur les données de diffusion à  $t_d$  ultra-courts du NAA, de la tCr et des tCho.

	<b>NAA</b>	<b>tCr</b>	<b>tCho</b>
<b><math>D_0</math></b> ( $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ )	0.31	0.36	0.31
<b><math>S/V</math></b> ( $\mu\text{m}^{-1}$ )	2.86	2.53	2.39
<b><math>R</math></b> ( $\mu\text{m}$ )	0.70	0.79	0.84

L'ordre de grandeur de l'estimation des rayons est tout à fait en accord avec la littérature et assez proche des ceux extraits avec le modèle des cylindres infinis. Les coefficients de diffusion intracellulaire libre semblent bas, notamment par rapport à ceux extraits par la modélisation des données à hautes valeurs de  $b$  (cf §8.3 ; mesures détaillées en §6.3 ; Palombo et al. 2016), et mènent à une viscosité du cytosol qui serait environ 2.7 fois plus importante que celle de l'eau libre.

Cependant il n'est pas certain que la diffusion des métabolites intracellulaires mesurée, même à partir de 100 Hz et en excluant le premier point à 50 Hz, peut vraiment être considérée comme étant dans la limite des temps très courts

Lemberskiy et al. (2017) ont défini une fréquence de coupure qui donne une limite au régime de diffusion correspondant à l'approximation des temps très courts de Mitra, avec  $f_{\min} = \frac{D_0}{L^2}$ . En prenant comme longueur caractéristique le diamètre et le  $D_0$  estimés avec le fit réalisé à partir de  $f=100$  Hz, on vérifie que la fréquence de mesure est supérieure à  $f_{\min}$ . Le processus est itératif et à partir de 150-200 Hz, la fréquence de mesure est bien supérieure à  $f_{\min}$  (sauf pour le NAA dont la fréquence de coupure est plutôt autour de 200 Hz). L'important est que cela ne change pas grand-chose sur l'estimation des paramètres d'intérêt (environ  $+0.02 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  pour  $D_0$  et  $-0.05 \mu\text{m}$  pour  $R$  avec une régression linéaire à partir de 200 Hz).

Le coefficient de diffusion intracellulaire estimé semble trop faible et il pourrait y avoir un biais dans cette estimation, peut-être à cause des structures secondaires (notamment les épines dendritiques des neurones et les leaflets des astrocytes). L'étude de Palombo et. al (2017) étudie l'influence potentielle de ces structures secondaires sur la diffusion des métabolites en comparant deux approches méthodologiques différentes : la mesure de l'ADC en fonction du temps de diffusion (gradients pulsés) ou de la fréquence (gradients oscillants) et la mesure de l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion. Il est probable que ces structures, de petite taille, diminuent artificiellement nos estimations du coefficient de diffusion intracellulaire libre. Ce qui signifie qu'il faut probablement aller vers des temps de diffusion encore plus courts et le régime de Mitra ne serait jamais vraiment accessible expérimentalement. Cependant l'estimation des ratios surface sur volume semble bonne d'après les simulations effectuées par Marco.

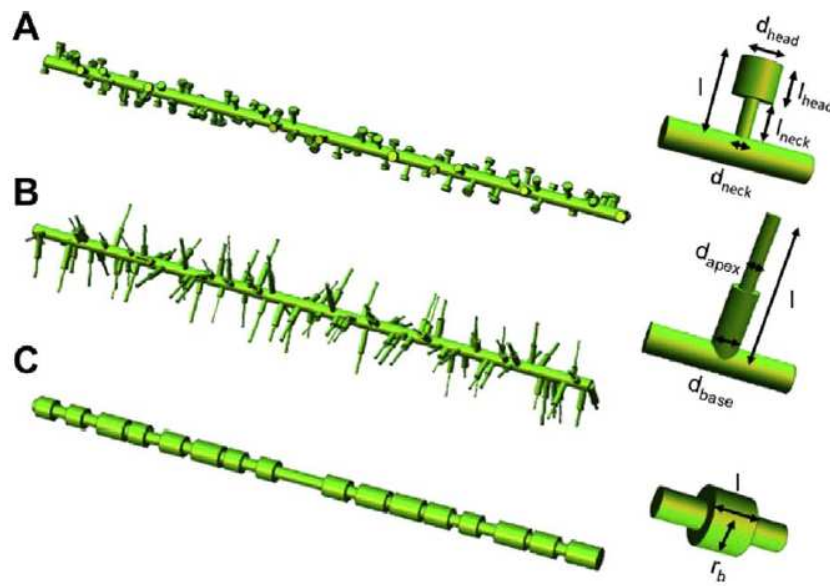
## 8.6 Discussion

Dans une étude de simulations numériques de Palombo et al. (2017), l'influence des structures secondaires de petite taille (épines dendritiques, feuillet astrocytaires et varicosités) sur l'atténuation du signal en fonction de  $b$  ou sur l'ADC en fonction de  $t_d$  est étudiée. La diffusion de  $N=10^5$  spins est simulée à l'intérieur de processus complexifiés comme le montre la Figure 8-6. Le rayon du cylindre principal est fixé à  $R=1 \mu\text{m}$  et le  $S/V=2/R=2 \mu\text{m}^{-1}$ . La densité des structures secondaires (épines dendritiques et feuillet astrocytaires) ou leur longueur et amplitude est variable. Le coefficient de diffusion intracellulaire libre est fixé à  $0.5 \mu\text{m}^2$ . Les temps de diffusion et les pondérations en diffusion sont comparables à ceux utilisés dans les expériences décrites dans l'ensemble de la partie 2. Puis ces courbes de diffusion simulées sont analysées avec les modèles décrits en amont.

L'extension spatiale de la cellule (longueur des fibres,  $N_{\text{branch}}$  et  $L_{\text{segment}}$ ) ne peut bien sûr être appréhendée qu'à partir de mesures à longs temps de diffusion. D'après les simulations numériques, à partir de  $t_d=200$  ms, les structures secondaires n'ont plus d'influence sur l'évolution de l'ADC des métabolites en fonction du  $t_d$ . Pour extraire uniquement des caractéristiques relatives à l'extension spatiale des cellules ( $N_{\text{branch}}$  et  $L_{\text{segment}}$ ), il est donc préférable de ne considérer les mesures d'ADC qu'à partir de  $t_d=200$  ms afin de ne pas être biaisé par les paramètres qui influent sur la tortuosité, ce que nous n'avons pas fait pour la modélisation des données aux temps de diffusion longs présentée en §8.4.

L'extraction des paramètres de petite échelle spatiale ( $D_{\text{intra}}$ , rayon ou  $S/V$ ) peut se faire à partir des mesures à temps de diffusion très court (OGLASER, chapitre 7) ou à hautes valeurs de pondération en diffusion (STELASER, §6.3).





**Figure 8-6** : Processus neuronaux ou astrocytaires synthétiques, représentés par des cylindres et complexifiés par une structure secondaire de petite échelle : des épines dendritiques (A), des feuillet astrocytaires (B) et des varicosités (C). En conditions non pathologiques, les varicosités sont théoriquement très peu présentes. Extrait de Palombo et al. (2017).

### 8.6.1 S/V

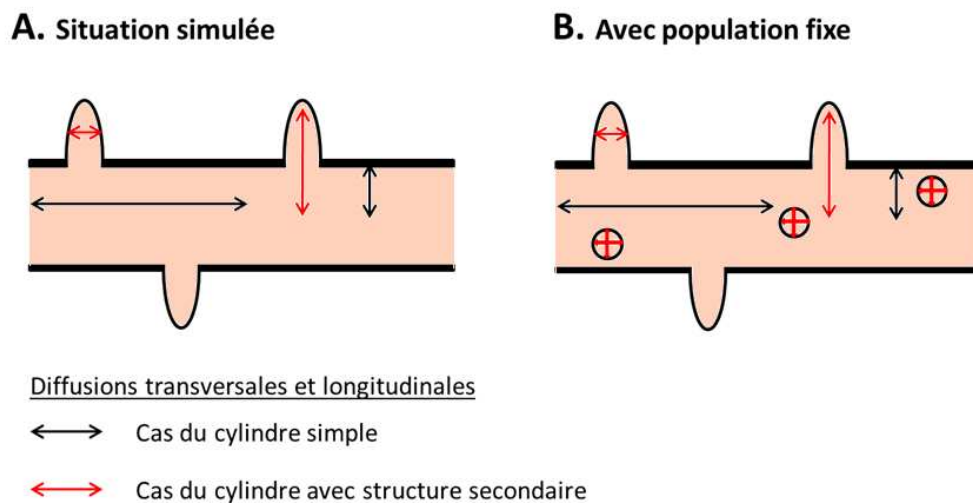
D'après les simulations réalisées par Marco Palombo, les mesures réalisées à  $\tau$  très courts, dans la limite de Mitra, avec les gradients oscillants rapportent très fidèlement les ratios S/V quel que soit la complexité des structures secondaires. Plus l'importance relative de ces dernières est grande, plus le rayon du processus principal est sous-évalué (ce qui est normal dans la mesure où le rayon est calculé à partir du S/V).

Le modèle des cylindres infinis appliqué aux hautes valeurs de pondération en diffusion évalue assez mal les S/V. En effet l'atténuation radiale du signal est sensible à ces structures secondaires, et plus elles sont importantes, moins la diffusion radiale est restreinte : c'est comme si le rayon augmentait. L'atténuation axiale du signal est monoexponentielle lorsque le cylindre est lisse, mais plus les structures secondaires sont importantes, plus elle dévie de ce comportement et tout se passe comme si le  $D_{\text{intra}}$  plus était faible (aux petites valeurs de  $b$ , à cause de la tortuosité) avec un effet de la restriction aux hautes valeurs  $b$ .

Cette différence de sensibilité explique notamment les différences obtenues d'évaluation du rayon entre nos mesures à haute pondération en diffusion et celles acquises avec les gradients oscillants.

Aux hautes valeurs de pondération en diffusion, à TE court, le rayon des fibres où diffuse le NAA est largement sous-estimé, voire nul, alors que la tendance attendue est inverse. Comme expliqué plus haut, cela peut être interprété comme une population fixe de NAA, liée aux mitochondries par exemple. L'effet de surévaluation du rayon à cause de la composante radiale de l'atténuation du signal pourrait être compensé par la présence de cette population fixe (représentée par de petites sphères sur la Figure 8-7), voire à TE court, ce phénomène pourrait très fortement contribuer à l'atténuation du signal. D'où la nécessité d'utiliser un modèle de cylindres infinis avec une fraction fixe pour essayer de mieux évaluer le rayon.

Nous ne rencontrons pas ce problème avec les mesures à temps de diffusion très court : le temps d'écho (TE=60 ms) que nous avons utilisé avec la OG-LASER est assez proche du temps d'écho le plus long (TE=73.4 ms) utilisé avec la STELASER et qui permet d'évaluer le rayon des fibres où diffuse le NAA. A temps d'écho plus court, le S/V serait sûrement surestimé pour le NAA, mais peut être dans une moindre mesure.



**Figure 8-7 :** Aux hautes valeurs de pondération en diffusion, en présence de structures secondaires, l'atténuation radiale du signal est plus importante, le rayon apparent est plus grand (A). En présence d'une population fixe, l'atténuation radiale du signal est à la fois influencée par les structures secondaires (moins de restriction) et la population fixe (plus de restriction) (B).

### 8.6.2 $D_{\text{intra}}$

Les simulations du modèle des cylindres infinis appliqués aux mesures d'ADC en fonction de la fréquence ne sont pas présentées car les résultats étaient absurdes dès que des structures secondaires étaient ajoutées.

Nous avons donc davantage confiance dans la modélisation sans a priori géométrique effectuée dans la limite de Mitra.

Dès que les structures secondaires prennent de l'importance, le  $D_{\text{intra}}$  est sous-évalué, que ce soit une estimation provenant des mesures aux hautes pondérations en diffusion ou des mesure d'ADC avec les gradients oscillants. L'estimation est en générale d'autant moins bonne dans le premier cas, notamment s'il s'agit d'une augmentation de la densité des structures secondaires. Cela pourrait expliquer pourquoi les  $D_{\text{intra}}$  que nous trouvons dans la partie 8-e en mesurant l'ADC des métabolites jusqu'à 667 Hz semblent faible : ils devraient être au moins égaux aux  $D_{\text{intra}}$  estimés avec le modèle des cylindres infinis appliqué aux hautes valeurs de  $b$ . Nous pensons que la limite de Mitra n'est peut-être pas encore atteinte et qu'il faudrait aller à des fréquences encore plus importantes pour atteindre le  $D_{\text{intra}}$ .

## 8.7 Conclusion et publications associées

La mesure de la diffusion des métabolites est sensible à la restriction imposée par les paramètres géométriques des cellules (diamètre, longueur des fibres,  $S/V$ ). La modélisation des données de diffusion est prometteuse, permet de quantifier ces paramètres et aide à la compréhension générale de nos mesures. La comparaison avec l'histologie est plus directe car la génération d'un tissu synthétique (ou virtuel) permet d'utiliser les mêmes outils d'analyse (exemple de l'analyse de Sholl).

Dans la partie 3, le modèle des cylindres infinis ainsi que le modèle d'histologie virtuelle (longs  $t_d$ ) sont appliqués aux mesures à haute pondération en diffusion et à long temps de diffusion effectuées sur un modèle d'activation astrocytaire (chapitre 10).

## Publications associées

### *Articles scientifiques*

- Palombo, M., Ligneul, C., Najac, C., Le, J., Flament, J., & Escartin, C. (2016). New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24), 6671–6676. doi:10.1073/pnas.1504327113 (**chapitre 6**)
- Palombo, M., Ligneul, C., Hernandez-Garzon, E., & Valette, J. (2017). Can we detect the effect of spines and leaflets on the diffusion of brain intracellular metabolites ? *NeuroImage*, (May). doi:10.1016/j.neuroimage.2017.05.003
- Palombo, M., Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Modeling Diffusion of Intracellular Metabolites in the Mouse Brain up to Very High Diffusion-Weighting : Diffusion in Long Fibers ( Almost ) Accounts for Non-Monoexponential Attenuation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 350(November 2016), 343–350. doi:10.1002/mrm.26548

*Communications orales*

- Ligneul, C., Palombo, M., Flament, J., & Valette, J. (2017). Approaching free intracellular diffusion by diffusion-weighted MRS at ultra-short time scales : initial results in the rodent brain using a 1.5 T/m gradient. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 25* (Vol. 71, p. 1082). (**chapitre 7**)



# **PARTIE 3**

**SPECTROSCOPIE DE DIFFUSION :**

**BIOMARQUEUR DE LA MORPHOLOGIE  
CELLULAIRE ?**



La qualité des acquisitions obtenues avec la STELASER (chapitre 6) nous invite naturellement à utiliser cette séquence en exploitant les possibilités qu'elle offre aux hautes valeurs de pondération en diffusion (accès au diamètre moyen des fibres) et aux longs temps de diffusion (accès à la longueur moyenne des fibres). Nous gardons les mesures réalisées avec gradients oscillants, davantage variables et chronophages, pour l'exploration fondamentale des très courtes distances de diffusion.

En contexte pathologique, tout un ensemble de variables morphologiques et métaboliques est susceptible de changer, de surcroît de manière hétérogène selon les structures du cerveau. Peu de temps après avoir développé la STELASER pour les hautes pondérations en diffusion, nous avons eu la possibilité de scanner des souris 3xTg, modèle de la maladie d'Alzheimer, âgées de 18 mois. Ce modèle présente théoriquement des plaques A $\beta$  extracellulaires et une activation astrocytaire associée. Nous avons donc réalisé des mesures jusqu'à  $b=20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ( $t_d=23 \text{ ms}$ ) dans l'hippocampe de ces souris. Les résultats ont été présentés au congrès annuel de l'ISMRM de Singapour (2016) (voir Annexe) et suggèrent une augmentation du diamètre des fibres dans lesquelles diffusent les métabolites astrocytaires. Cependant nous n'avons pas extrait les cerveaux de ces souris et nous n'avons même pas pu réaliser un marquage immunohistochimique de la GFAP pour confirmer ou infirmer la présence d'activation astrocytaire dans l'hippocampe de ces souris 3xTg. Les variations en spectroscopie et en spectroscopie de diffusion rapportées étant encourageantes, nous avons décidé d'étudier un modèle mieux caractérisé dans lequel, si possible, la morphologie d'un type cellulaire varie de manière massive et homogène dans le cerveau de souris. Nous avons alors choisi d'étudier un modèle d'activation astrocytaire induit par transfert de gène CNTF (ciliary neurotrophic factor), bien maîtrisé au laboratoire. Cette étude est présentée dans le chapitre 9 et nous permet d'attester de la sensibilité de la spectroscopie de diffusion à un changement de morphologie cellulaire. Cette preuve de concept nous aide à mieux interpréter les mesures de spectroscopie de diffusion, en association avec les résultats issus de la modélisation et de la microscopie. Enfin, les mêmes mesures ont été réalisées sur un modèle de souris transgénique de la maladie de Huntington (R6/1), présentées dans le chapitre 10. Les conclusions sont plus difficiles à établir que pour le modèle d'activation astrocytaire, mais la modélisation et la microscopie co-focale, inachevées au moment de l'écriture du manuscrit, permettront d'éclaircir certains points d'interprétation que nous proposons dans la discussion.



## CHAPITRE 9

### Variation massive de la morphologie astrocytaire : la spectroscopie de diffusion y est-elle sensible ?

---

#### 9.1 Un modèle d'activation astrocytaire, induit par transfert du gène CNTF.

##### 9.1.1 Le CNTF protège de la perte neuronale en conditions pathologiques

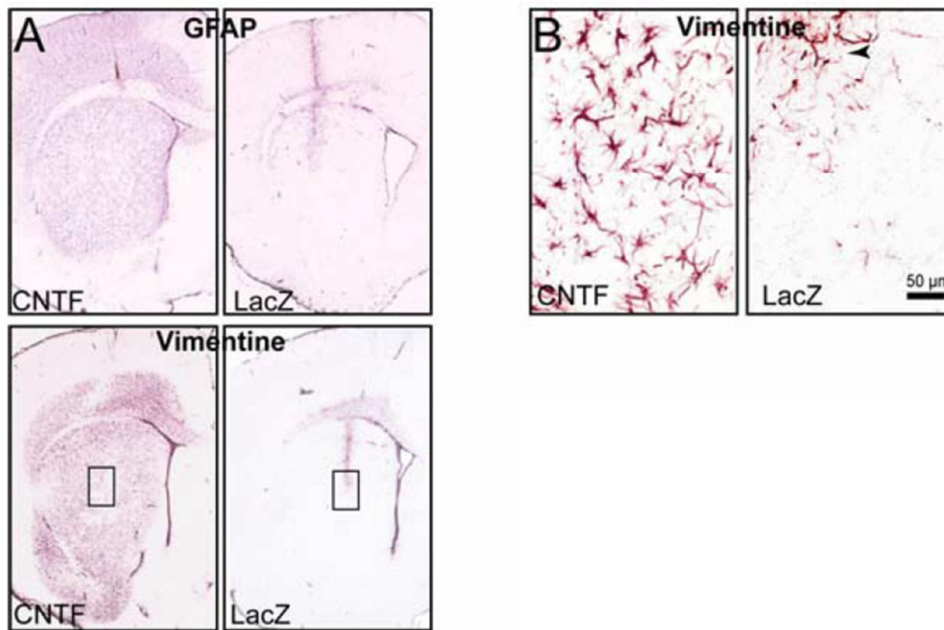
Le facteur neurotrophique ciliaire (ciliary neurotrophique factor, CNTF) est une cytokine supposée être neuroprotectrice. A l'état basal, elle est exprimée notamment dans les nerfs périphériques, le bulbe olfactif et le nerf optique (Stockli et al., 1991 ; Sendtner et al., 1994) et très peu dans le reste du SNC. D'abord étudié pour la protection potentielle qu'il offre aux motoneurones (Adler et al., 1979 ; Manthorpe et al., 1980), le CNTF a été un espoir thérapeutique pour la sclérose latérale amyotrophique (SLA), mais sans succès (Aebischer et al., 1996). Puis il a notamment été étudié pour son action sur les neurones du striatum, protégeant ce dernier de la perte neuronale suite à une injection de quinolinate (Anderson et al., 1996). L'injection de CNTF avec des vecteurs viraux a permis de mettre en évidence son action neuroprotectrice à plus long terme chez le rat (de Almeida et al., 2001), toujours face à une situation pathologique induite par quinolinate. Dans les années 2000, le CNTF devient un espoir thérapeutique pour la maladie de Huntington cette fois, mais les résultats de l'essai clinique sont décevants (Bloch et al., 2004). Il est encore en essai clinique pour diverses maladies de dégénérescence de la rétine.

Dans toutes les études menées en rapport avec ses propriétés neuroprotectrices, seule la perte neuronale est quantifiée : le CNTF empêche donc la perte neuronale, mais le mécanisme d'action est mal compris.

##### 9.1.2 Le CNTF comme modèle d'activation astrocytaire

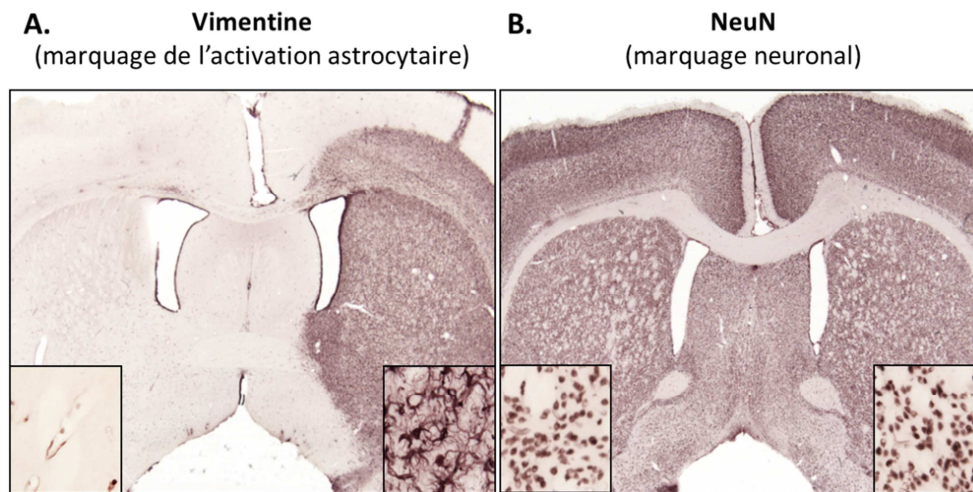
L'activation astrocytaire est principalement caractérisée par une hypertrophie des astrocytes et une surexpression de la GFAP (cf §1.2). Le CNTF est un activateur endogène des astrocytes et sa quantité augmente naturellement suite à une lésion mécanique (Lee et al., 1998) et excitotoxique (Haas et al., 2004). Pour activer les astrocytes de régions où le CNTF n'est pas naturellement présent, surexprimer le CNTF par transfert de gènes (en injection lentivirale ou adénovirale) fonctionne bien (Lisovoski et al., 1997 ; van Adel et al., 2005). Le volume des astrocytes en contact avec le CNTF augmente significativement, aussi bien dans la matière grise que dans la matière blanche (Hudgins et Levison, 1997). La surexpression de CNTF injecté par lentivirus dans le striatum de rat induit une activation astrocytaire stable (dès 15 jours et jusqu'au-delà de 6 mois après l'injection) et conduit également à

l'expression de vimentine et de nestine, protéines des filaments intermédiaires caractéristique des astrocytes immatures (Figure 9-1, Escartin et al., 2006). La surexpression des protéines astrocytaires (GFAP, vimentine, nestine) n'est pas liée à une prolifération des astrocytes, mais bien à une activation de ceux qui préexistent.



**Figure 9-1** : (A) expression de la vimentine et de la GFAP dans une coupe de cerveau de rat, qui a subi une injection de CNTF (gauche) ou de  $\beta$ -galactosidase (droite). La cicatrice gliale est très nette sur les rats contrôles et l'aiguille utilisée pour l'injection provoque une activation astrocytaire très spécifique au chemin de celle-ci. (B) Zoom sur l'expression de la vimentine, autour du site d'injection pour qu'elle soit visible chez les rats contrôle. Extrait d'Escartin et al. (2006).

Aucune perte neuronale n'est notée lorsqu'un marquage immunohistochimique de NeuN est réalisé (Figure 9-2). NeuN marque les noyaux des neurones : ce marquage ne donne pas d'indication sur l'état du neurone autre que vivant ou mort. Cependant les niveaux d'expression de nombreuses protéines neuronales (caractéristiques notamment de la transmission synaptique), étudiés par Escartin et al. (2006), sont stables entre les rats injectés avec du CNTF et les rats injectés avec de la  $\beta$ -galactosidase : aucun dysfonctionnement neuronal n'a été mis en évidence par ces analyses. L'étude de Zala et al. (2004) note toutefois une tendance à la baisse du nombre de neurones marqués avec DARPP-32 chez les souris WT CNTF par rapport aux souris WT LacZ (effet long terme).



**Figure 9-2** : Coupe de cerveau de rat ayant subi une injection bilatérale,  $\beta$ -galactosidase sur l'hémisphère gauche et CNTF sur l'hémisphère droit. Le marquage de la vimentine révèle une activation astrocytaire très nette sur l'hémisphère droit (A) et pas de perte neuronale relativement aux rats contrôle (B). Extrait de Carrillo-de Sauvage et al., (2015).

### 9.1.3 La $\beta$ -galactosidase comme contrôle, gène correspondant LacZ

La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme permettant d'hydrolyser le lactose. C'est le produit de l'expression du gène LacZ, proposé entre autres comme gène rapporteur pour les greffes intracérébrales (Shimohama et al., 1988) et étant presque toujours le gène contrôle face à un transfert de gène CNTF. Face à l'injection par virus d'un gène qui est massivement surexprimé, le meilleur contrôle n'est pas forcément la simple injection de PBS, notamment pour qu'il y ait une transfection aussi bien chez les animaux contrôle que chez les animaux porteurs du CNTF. L'expression de la  $\beta$ -galactosidase n'a a priori pas de conséquence spécifique sur le fonctionnement du cerveau, même lorsqu'elle est exprimée sur une durée de plusieurs mois dans le cerveau de rat (de Almeida et al., 2001).

Le CNTF est donc un bon modèle d'activation astrocytaire : l'hypertrophie des astrocytes est quantifiable et massive et c'est le « seul » paramètre variable : il n'engendre a priori pas de dysfonctionnement neuronal.

Dans la Partie 2, les méthodes développées permettent, en théorie, d'avoir accès au diamètre moyen et à la longueur moyenne des processus astrocytaires et neuronaux présents dans le voxel utilisé pour la mesure. Avec ce modèle d'activation astrocytaire, nous voulons vérifier la sensibilité de la spectroscopie de diffusion aux variations de morphologie des astrocytes avec une mesure directe. Si aucune différence n'est observée entre les deux groupes sur un modèle où l'activation astrocytaire est aussi importante, la

méthode ne sera certainement pas assez sensible pour être utilisée en conditions pathologiques, où les variations de morphologie sont plus fines. Si la mesure est sensible à la variation de morphologie, la modélisation des données permettra d'accéder quantitativement aux paramètres morphologiques, que nous comparerons avec les données issues de la microscopie.

## **9.2 Méthodes spécifiques et principe de l'expérience**

### **9.2.1 Protocole expérimental général**

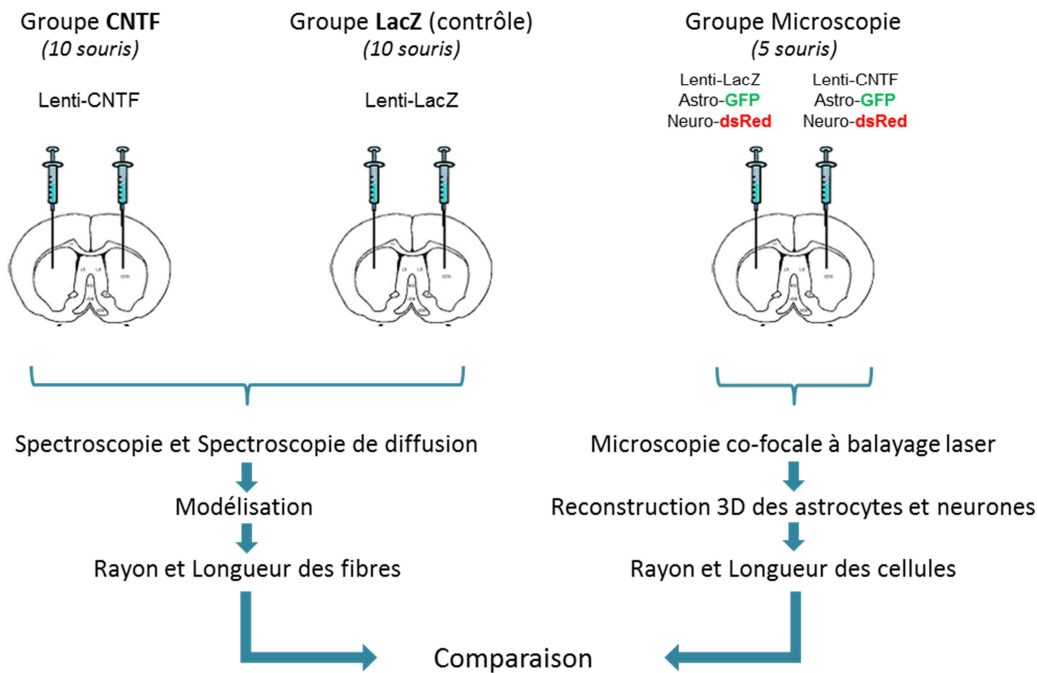
L'idée de cette série d'expériences est donc d'attester de la sensibilité de la spectroscopie de diffusion aux changements de morphologie des neurones et des astrocytes (Figure 9-3).

Les gènes LacZ et CNTF sont introduits dans des constructions lentivirales spécifiques ciblant presque exclusivement les neurones du striatum et décrites dans Escartin et al. (2006) et caractérisées par de Almeida et al. (2001). Nous parlerons de lenti-LacZ ou lenti-CNTF.

Pour cette étude, 25 souris mâles C57Bl6 âgées de 6-8 semaines réparties en 3 groupes ont été injectées (injections réalisées par Sueva Bernier, Martine Guillermier et Charlène Joséphine):

- groupe « CNTF » (10 souris). Les souris ont été injectées bilatéralement dans le striatum avec des lenti-CNTF.
- groupe « LacZ » (10 souris). Les souris ont été injectées bilatéralement dans le striatum avec des lenti-LacZ.
- groupe destiné à la microscopie co-focale (5 souris). Afin d'avoir un contrôle direct de la morphologie réelle des astrocytes et des neurones, nous avons utilisé des lentivirus exprimant la GFP (protéine fluorescente verte) et ciblant préférentiellement les astrocytes et des lentivirus exprimant la dsRed (protéine fluorescente rouge) ciblant préférentiellement les neurones. Dans chaque hémisphère ces deux types de lentivirus à protéines fluorescentes ont été injectés en plus des lenti-LacZ (à gauche) et des lenti-CNTF (à droite).

Six à huit semaines après l'injection, les groupes CNTF et LacZ ont été scannés et le groupe microscopie perfusé. Tout ce qui est relatif au groupe microscopie (perfusion, microscopie, reconstruction, extraction des paramètres d'intérêt) a été réalisé par Edwin Hernandez-Garzon, post-doctorant au laboratoire dans l'équipe RMN.



**Figure 9-3 :** Protocole expérimental général

### 9.2.2 Protocole expérimental des expériences de RMN

Au cours d'une session, trois types de mesures sont réalisées :

- Acquisitions de l'atténuation du signal des métabolites aux hautes de valeurs de pondération en diffusion à temps de diffusion relativement court ( $t_d=53.2$  ms). Les paramètres de la STELASER sont  $TM/TR=50/2000$  ms. Les points sont acquis à 7 valeurs de  $b$  (0.02, 3.02, 6, 10, 20, 30 et 50  $ms/\mu m^2$ ). Chaque acquisition est la somme de 128 répétitions. Voxel 56  $\mu l$  autour du striatum (Figure 9-4-A).
- Acquisitions des ADC des métabolites aux temps de diffusion longs avec un  $\Delta b$  fixé à 3  $ms/\mu m^2$  avec la STELASER. En plus de l'acquisition à  $t_d=53.2$  ms venant de l'expérience aux hautes valeurs de  $b$ , l'ADC à 5 temps de diffusion est mesuré. Les paramètres d'acquisition spécifiques sont rassemblés dans la Table 9-1 ci-dessous. Voxel 56  $\mu l$  autour du striatum (Figure 9-4-A).
- Acquisition d'un spectre de macromolécules (cf §5.3) dans le voxel de 56  $\mu l$ . Pour chaque groupe, les spectres sont sommés sur les 10 animaux et la résultante est insérée dans la base LCModel.
- Spectroscopie dans des voxels de 8  $\mu l$  situés autour du striatum et du thalamus. La séquence LASER est utilisée ( $TE/TR=20/5000$  ms, 128 répétitions directement moyennées) (Figure 9-4-B, C).

Table 9-1 : Paramètres des acquisitions à temps de diffusion longs

<b>t<sub>d</sub></b> (ms)	<b>TM</b> (ms)	<b>TR</b> (ms)	<b>b<sub>0</sub></b> (ms/μm <sup>2</sup> )	<b>Nombre de répétitions</b>
253.2	250	2200	0.100	128
503.2	500	2500	0.200	128
1003.2	1000	3000	0.300	128
1503.2	1500	3500	0.450	512
2003.2	2000	4000	0.600	512

Les expériences de spectroscopie de diffusion (STELASER) sont réalisées avec la suppression de l'eau optimisée (§6.2.2). Les gradients de diffusion ont une durée  $\delta=3$  ms et le temps d'écho est fixé à 33.4 ms pour l'ensemble des mesures.

Le temps total d'une session est environ 5h30 et la souris est anesthésiée environ 5h dans les conditions précisées en §5.1.1.

### **9.2.3 Observations physiologiques**

Les souris du groupe CNTF sont significativement plus légères que les souris du groupe contrôle ( $24.7 \pm 2.4$  g pour le groupe CNTF versus  $28.3 \pm 0.7$  g pour le groupe LacZ,  $p$ -value=0.003) et respirent plus lentement sous isoflurane. Injecté chez la souris par lentivirus, le CNTF diffuse vraiment dans tout le cerveau et affecte l'ensemble des structures. L'hypothalamus notamment régule la prise alimentaire grâce à la leptine (« l'hormone de la satiété ») et le CNTF agirait d'une façon analogue à la leptine (Lambert et al., 2001), expliquant cette différence de poids.

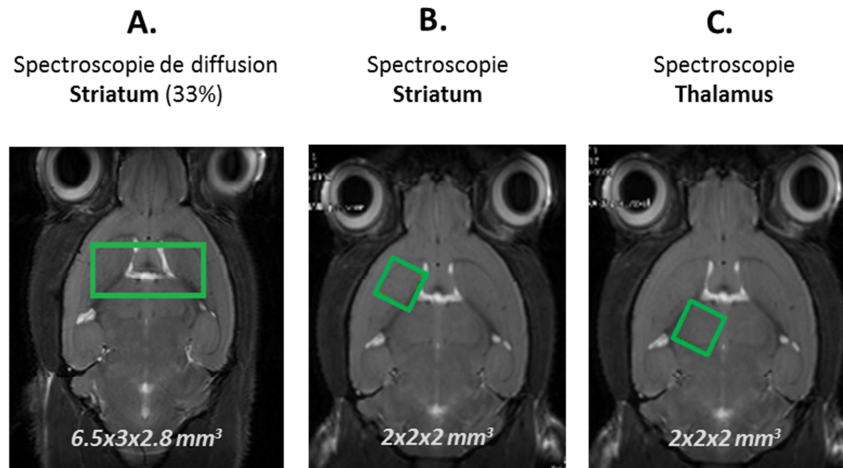
## **9.3 Le profil spectroscopique**

### **9.3.1 Le voxel**

Le voxel utilisé pour les mesures de spectroscopie de diffusion de  $6.5 \times 3 \times 2.8 = 56$  μl est placé autour du striatum comme sur la Figure 9-4-A. Le voxel a une composition hétérogène et contient plusieurs régions distinctes:

- Caudoputamen (site d'injection), partie principale du striatum, site d'injection et que nous appellerons généralement striatum
- Thalamus
- Septum, autre partie appartenant au striatum

- Ventricules
- Matière blanche (négligeable)



**Figure 9-4** : Images anatomiques de cerveau de souris pondérées en T<sub>2</sub>. Illustration du positionnement du voxel pour les expériences de spectroscopie de diffusion (A) et de spectroscopie classique (B, C). Le caudoputamen, le thalamus et le septum sont repérables anatomiquement grâce à la délimitation par le peu de matière blanche présente (de T<sub>2</sub> court, apparaît en hyposignal) et aux ventricules (T<sub>2</sub> plus long, apparaît en hypersignal).

A partir des images anatomiques pondérées en T<sub>2</sub> de chaque souris, nous avons évalué le volume du striatum des groupes CNTF et LacZ puis établi la proportion de striatum présente dans le voxel (Table 9-2).

**Table 9-2** : Volume du striatum et du striatum contenu dans le voxel de 56 µl mesurés à partir d'images anatomiques pondérées en T<sub>2</sub> sur l'ensemble des souris de chaque groupe.

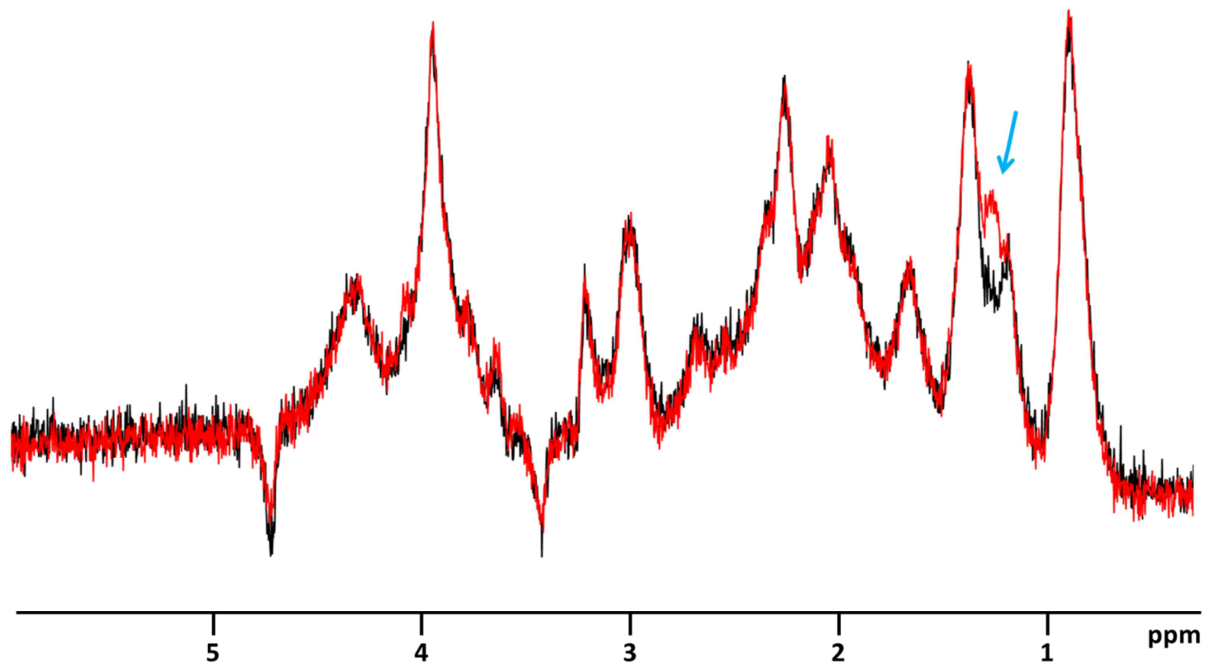
	<b>CNTF</b>	<b>LacZ</b>
Volume du striatum (µL)	31.6 ± 2.0	31.4 ± 1.6
Volume du striatum contenu le voxel de 56 µl (µL)	18.9 ± 1.9	18.6 ± 1.9
$V_{\text{striatum} \rightarrow \text{voxel}} / V_{\text{voxel}}$ (%)	33.8 ± 3.3	33.2 ± 3.4

Il n'y a pas de différence volumique entre les structures striatales des CNTF et des LacZ. Le striatum représente 1/3 du volume du voxel total. La spectroscopie réalisée spécifiquement autour du site d'injection et un peu plus loin, dans le thalamus permet de vérifier que l'expression du CNTF est largement répandue dans le cerveau de la souris (en théorie c'est le cas). Cela permet ensuite de savoir si

les potentielles variations mesurées entre les deux groupes proviennent de l'ensemble du voxel, ou seulement d'une partie.

### 9.3.2 Les macromolécules

Les macromolécules sont particulièrement stables sur tout l'ensemble du spectre, sauf à 1.1-1.2 ppm où une contribution supplémentaire au spectre est notable pour le groupe CNTF (Figure 9-5). Cette contribution supplémentaire pourrait correspondre à de la thréonine ou du beta-hydroxybutyrate (Urenjak et al., 1993). Elle est aussi notable, surtout sur le spectre acquis autour du site d'injection (Figure 9-6-A). Les spectres acquis dans le voxel de 56  $\mu$ l sont analysés sous LCMoel pour chaque groupe avec la base de macromolécules correspondante.



**Figure 9-5** : Spectre de macromolécules, résultante de la somme sur les groupes entier pour le groupe LacZ (noir) et le groupe CNTF (rouge). La flèche bleue indique la contribution supplémentaire de thréonine ou de  $\beta$ -hydroxybutyrate au spectre de macromolécules du groupe CNTF. Avant intégration dans la base LCMoel, une SVD a été effectuée sur le tCr résiduelle à 3.9 ppm et sur la contribution négative de taurine.

Dans la mesure où il n'y a pas d'atrophie du striatum, et que nous n'avons pas noté (à l'œil) de différence de volume des ventricules entre les deux groupes, la quantité de tissu est sensiblement la même au sein de chaque voxel étudié. Le profil de macromolécules est stable d'une région à l'autre (par exemple chez



l'humain entre matière grise et matière blanche, Snoussi et al., 2015). De plus, les résonances larges des macromolécules proviennent principalement des acides aminés contenus dans l'ensemble des protéines du cytosol (Behar et Ogino, 1993), donc le spectre de macromolécules, résultat d'une moyenne très large de contributions diverses est stable. Une variabilité très spécifique peut éventuellement apparaître à un endroit précis du spectre si une protéine très riche en un acide aminé donné est fortement surexprimée (par exemple la contribution supplémentaire observée à 1.2-1.3 ppm sur le spectre de macromolécules du groupe CNTF).

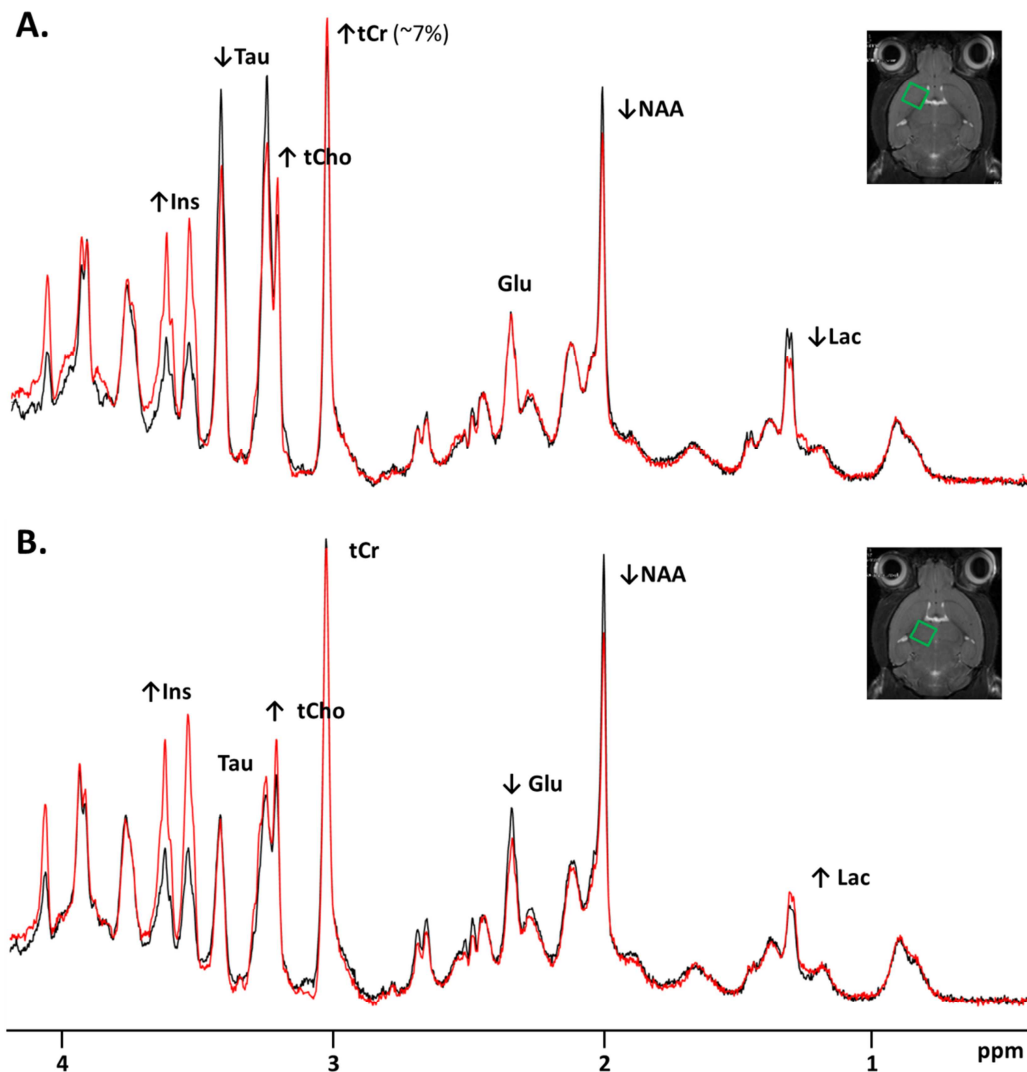
### **9.3.3 Voxels spécifiques de 8 µl du striatum ou du thalamus**

La spectroscopie a été réalisée sur 6 souris de chaque groupe. Dans les deux régions d'intérêt, une baisse du NAA et une augmentation du myo-Inositol sont très marquées (Figure 9-6). La choline semble aussi augmenter légèrement.

Notons d'emblée que la résonance de macromolécules à 0.9 ppm est très stable entre les groupes CNTF et LacZ. Cela est en accord avec les spectres de macromolécules acquis dans chaque groupe et permet d'avoir d'autant plus confiance dans la pertinence d'une comparaison absolue de la somme de ces spectres.

Outre le NAA et l'Ins, l'effet du CNTF est assez hétérogène sur le striatum (Figure 9-6-A) et le thalamus (Figure 9-6-B). La normalisation par la créatine totale n'est pas possible dans le striatum car elle augmente d'environ 7% dans le groupe CNTF, alors qu'elle est stable dans le thalamus. Les pics à 3.91 ppm (créatine) et 3.93 ppm (phosphocréatine) indiquent que cette augmentation provient plutôt d'une augmentation de la concentration de phosphocréatine du groupe CNTF. Le glutamate est très stable dans le striatum alors qu'il diminue dans le thalamus. Enfin la taurine diminue nettement dans le striatum alors qu'elle est stable dans le thalamus. Cependant le niveau basal de taurine est beaucoup plus bas dans le thalamus que dans le striatum, une petite différence peut être moins facilement visible.

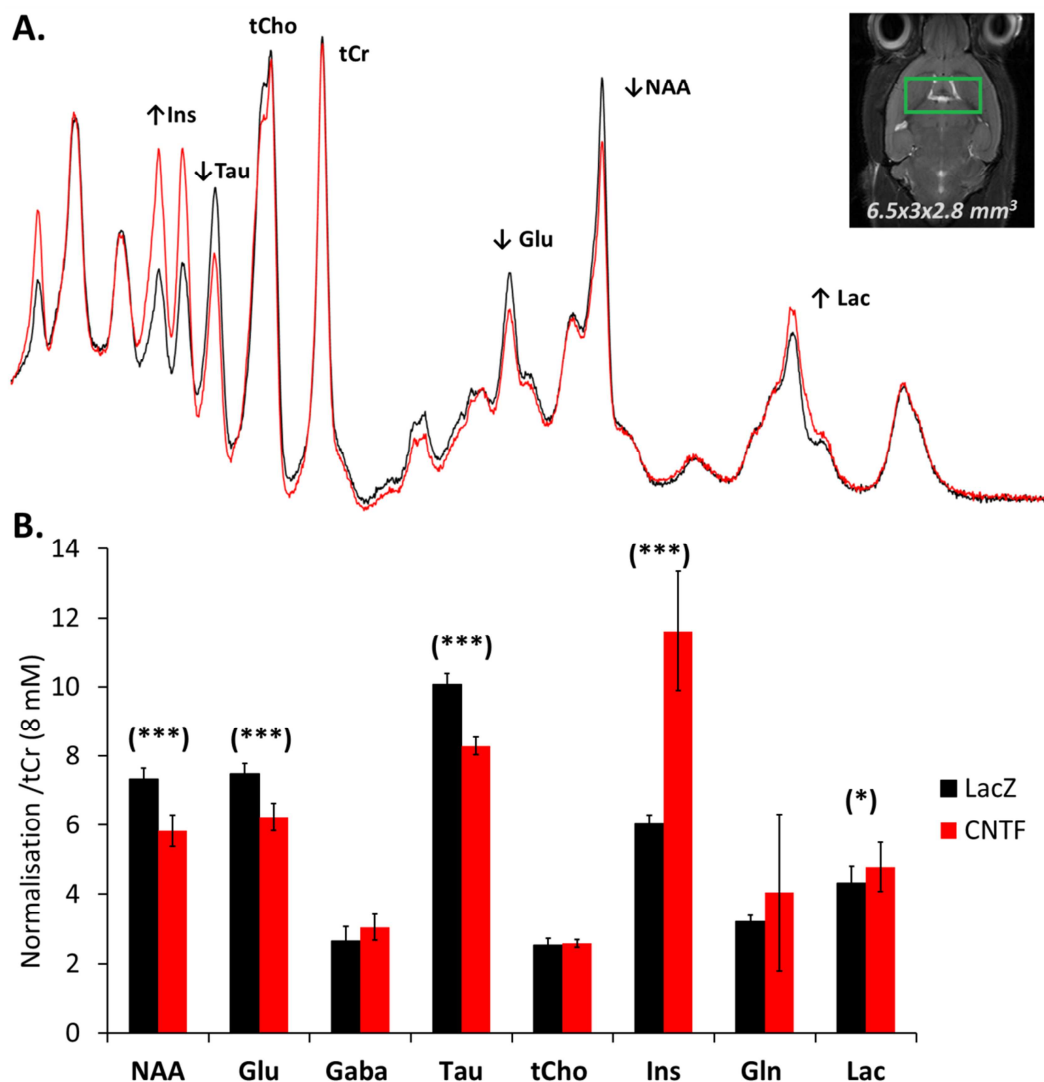
Les deux régions sont donc bien affectées par l'expression du CNTF, ce qui nous permet d'utiliser le grand voxel mixte pour la spectroscopie de diffusion.



**Figure 9-6 :** Somme réalisée sur l'ensemble des 6 spectres acquis dans le striatum avec la séquence LASER (TE=20 ms), autour du site d'injection (A) ou dans le thalamus un peu plus loin (B) pour le groupe LacZ (noir) ou CNTF (rouge).

### 9.3.4 Grand voxel mixte de 56 $\mu$ l

La concentration des métabolites plutôt neuronaux diminue dans le groupe CNTF, à hauteur de -20% pour le NAA et -17% pour le glutamate. La taurine diminue également (-18%). Cela pourrait être lié à une altération du métabolisme neuronal par rapport aux souris contrôle.



**Figure 9-7 :** (A) Somme réalisée sur l'ensemble des 10 spectres acquis à  $b=0.020 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la STELASER pour le groupe LacZ (noir) ou le groupe CNTF (rouge) (B) Concentrations normalisées par la tCr à 8mM, issues de l'analyse LCModel effectuée sur chaque spectre acquis à  $b=0.020 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour les deux groupes. Valeur statistique (Student t-test) : (\*\*\*)  $p$ -value < 0.001, (\*)  $p$ -value < 0.05

La concentration de myo-inositol, plutôt astrocytaire, augmente drastiquement (+92%) dans le groupe CNTF. Cela pourrait être mis en relation avec une altération du métabolisme astrocytaire, en lien avec l'activation astrocytaire.

La concentration de lactate augmente (+11%) chez les CNTF dans le voxel de  $56 \mu\text{l}$ . Au niveau des voxels de  $8 \mu\text{l}$ , le lactate baisse dans le striatum et augmente légèrement dans le thalamus. Mais comparer et interpréter les variations de concentration de lactate observées dans les voxels spécifiques de  $8 \mu\text{l}$  par

rapport au gros voxel de 56  $\mu\text{l}$  est compliqué, notamment à cause de l'isoflurane utilisé pour l'anesthésie, connu pour son influence sur les niveaux de lactate (Boretius et al., 2013). Le spectre à  $b=0.020 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  utilisé pour la spectroscopie du voxel de 56  $\mu\text{l}$  a été acquis dans les deux premières heures d'anesthésie tandis que les spectres correspondant aux petits voxels de 8  $\mu\text{l}$  étaient toujours acquis à la toute fin de l'expérience, avec un plus faible niveau d'isoflurane.

Une étude réalisée au laboratoire sur des rats injectés avec des lenti-CNTF et des lenti-LacZ (Carrillo-de Sauvage et al., 2015) présente des résultats similaires en spectroscopie. L'étude rapporte en plus une augmentation très nette de la choline chez les rats CNTF. Sur notre voxel de 56  $\mu\text{l}$ , les concentrations extraites par LCModel (Figure 9-7-B) sont stables (+2% pour les CNTF). Néanmoins, la choline semble augmenter dans les voxels spécifiques de 8  $\mu\text{l}$  (Figure 9-6). Le voxel de 56  $\mu\text{l}$  est moins bien shimé et en regardant attentivement la somme des spectres (Figure 9-7-A), d'une part la ligne de base des CNTF est légèrement plus basse sous la choline et la taurine et d'autre part le pic de taurine accolé au pic de choline diminue l'amplitude apparente de ce dernier. Cependant, une des résonances du myo-inositol se superpose aux résonances proches de la taurine et des composés cholinergiques : vue l'augmentation massive de la concentration de myo-inositol, ce pic peut être à la source de l'impression d'augmentation des tCho.

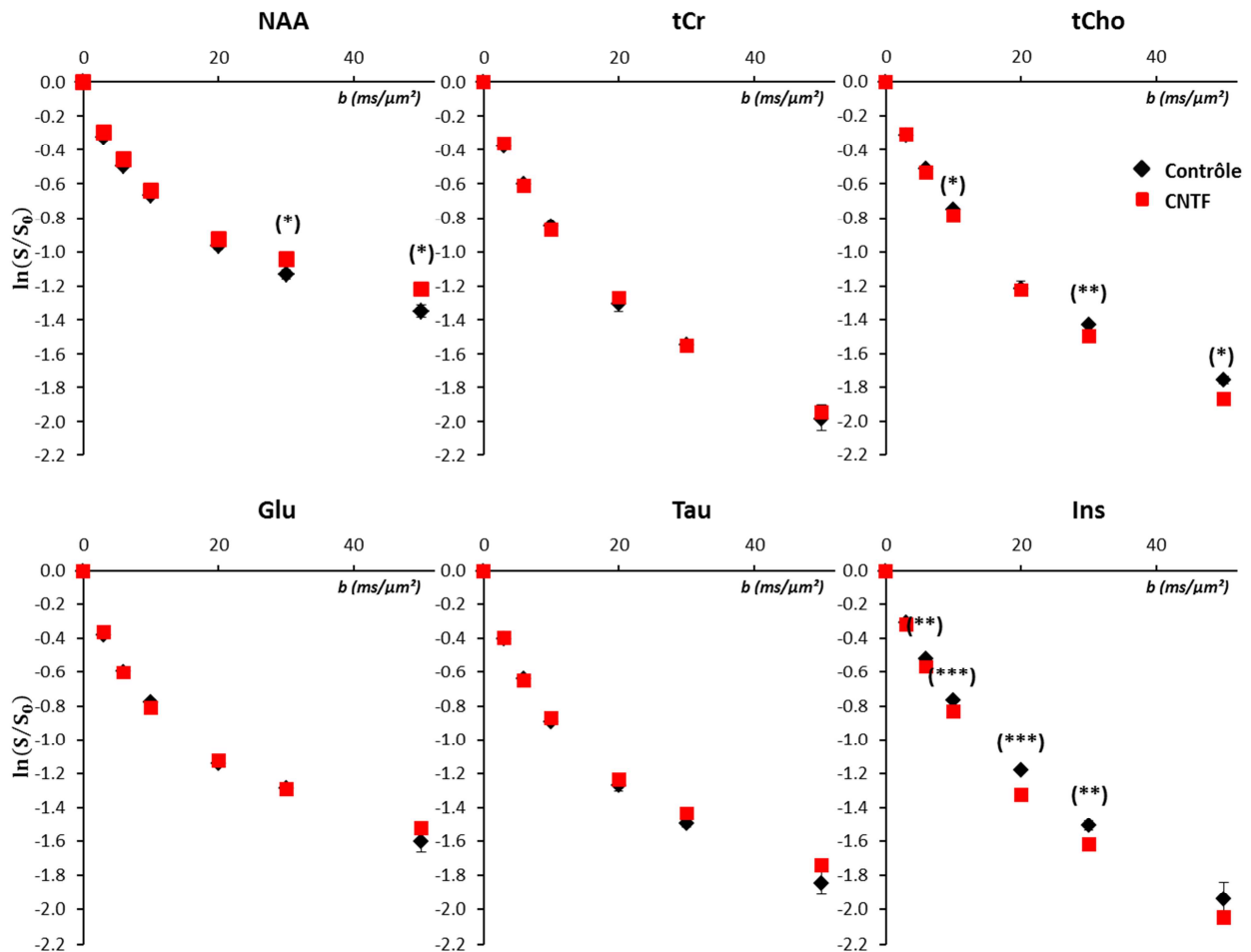
Enfin, le pic de macromolécules à 0.9 ppm est extrêmement stable (Figure 9-7-A) et lorsque la concentration des macromolécules est normalisée par la tCr à 8 mM, elle est également très stable (-0.9 %,  $p\text{-value}=0.71$ ). A part éventuellement pour la choline, nous sommes donc plutôt confiants à l'égard des estimations de variations de concentrations entre le groupe CNTF et le groupe LacZ que nous avons évaluées à l'aide de LCModel.

## **9.4 Spectroscopie de diffusion**

### **9.4.1 Mesures aux hautes valeurs de pondération en diffusion**

L'atténuation du signal aux hautes valeurs de  $b$  est significativement plus forte chez les souris CNTF pour les métabolites astrocytaires (Figure 9-8). L'effet est plus léger pour les composés cholinergiques, mais est très net pour le myo-Inositol. Le dernier point de l'Ins ne ressort pas statistiquement, notamment à cause du faible signal de l'inositol chez les souris LacZ, très résiduel à  $b=50 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , ce qui augmente la variabilité. Les composés cholinergiques et le myo-inositol semblent donc diffuser dans des compartiments aux fibres plus larges chez les CNTF que chez les LacZ, en accord avec l'activation astrocytaire.

L'atténuation du signal est significativement moins importante chez les souris CNTF pour le NAA aux très hautes valeurs de  $b$  (Figure 9-8), comme si le NAA diffusait dans des compartiments aux processus plus fins.



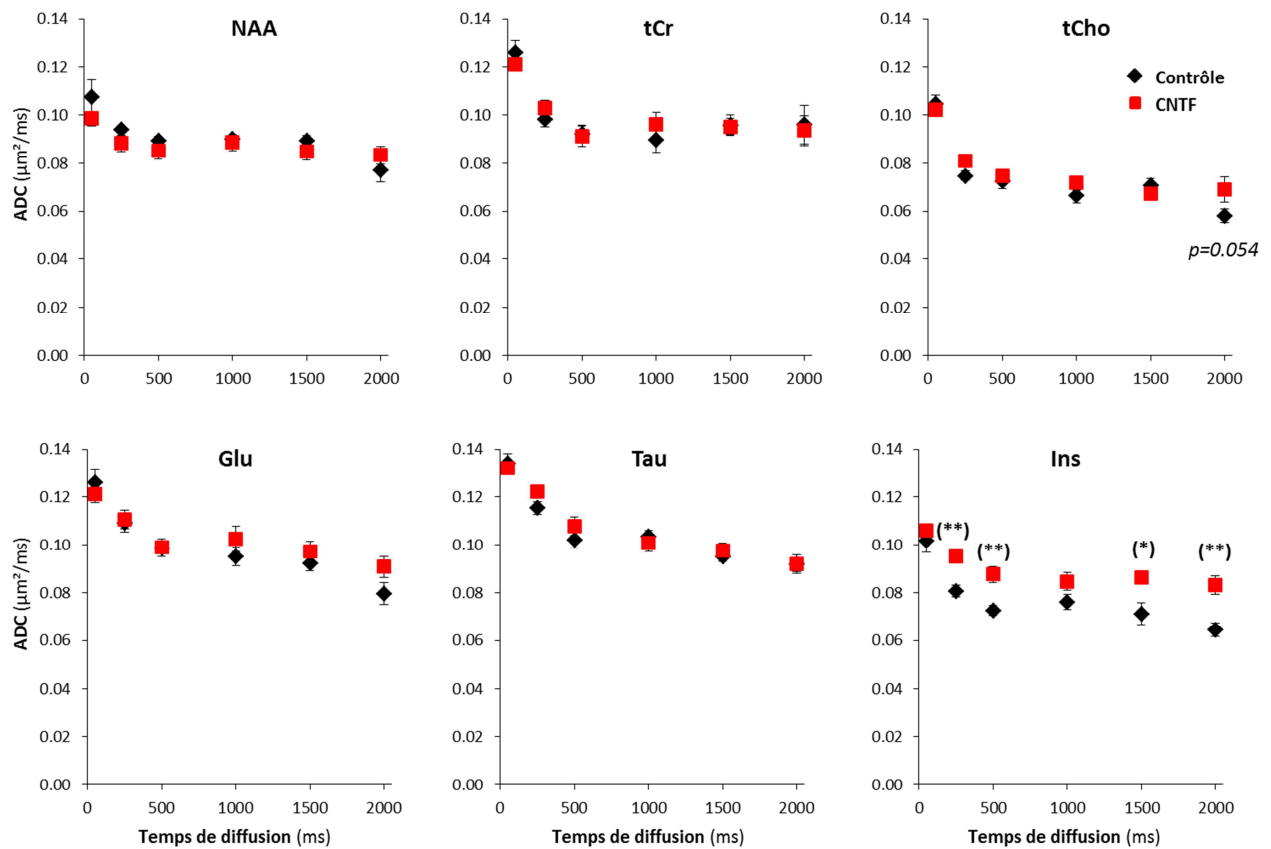
**Figure 9-8 :** Atténuation du signal aux hautes valeurs de pondération en diffusion pour les 6 métabolites principaux (NAA, Glu, tCr, Tau, tCho, Ins). Les barres d'erreur représentent les erreurs types. Valeur statistique (Student t-test) : (\*\*\*)  $p$ -value < 0.001, (\*\*)  $p$ -value < 0.01, (\*)  $p$ -value < 0.05.

Les atténuations des signaux de la créatine, du glutamate et de la taurine ne varient pas significativement entre les deux groupes, même si une tendance sur la taurine émerge (atténuation sensiblement moins importante).

L'atténuation du signal des macromolécules est très similaire entre les deux groupes. Une régression linéaire entre  $b=0.020$  et  $b=50$   $ms/\mu m^2$  conduit à  $ADC_{MM}=0.006$   $ms/\mu m^2$  ( $R^2=0.99$  pour les CNTF et  $R^2=0.96$  pour les LacZ).

## 9.4.2 Mesures de l'ADC aux longs temps de diffusion

L'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion est très semblable pour tous les métabolites (Figure 9-9) entre les groupes CNTF et LacZ. Seul l'ADC du myo-Inositol est beaucoup plus haut à presque tous les temps de diffusion, ce qui suggère à nouveau qu'il diffuse dans de plus gros compartiments. La choline exhibe une tendance similaire, mais non significative. L'ADC du NAA est très légèrement plus bas chez les souris CNTF (tendance sur tous les points sauf le point à  $t_d=2003.2$  ms), mais la différence n'est pas significative au point à point.



**Figure 9-9:** ADC en fonction du temps de diffusion pour les 6 métabolites principaux (NAA, Glu, tCr, Tau, tCho, Ins). Les barres d'erreur représentent les erreurs types. Valeur statistique (Student t-test) : (\*\*)  $p\text{-value} < 0.01$ , (\*)  $p\text{-value} < 0.05$ .

## 9.5 Modélisation des données

Pour modéliser l'atténuation du signal aux hautes valeurs de  $b$ , nous avons utilisé le modèle des cylindres infinis, présenté en §8.1 (Table 9-3). L'ajustement aux atténuations des signaux du NAA, du glutamate et

de la taurine donne des rayons proches de 0, le modèle avec une fraction fixe en plus (§8.3, Equation 8-2) permet donc de pallier le problème.

**Table 9-3:**  $D_{\text{intra}}$  et rayon extraits pour les groupes CNTF et LacZ d'après le modèle des cylindres infinis (ajout de la fraction fixe pour le NAA, Glu et Tau, Equation 8-2). L'estimation de ces paramètres, notamment pour le glutamate, est susceptible de changer en travaillant sur les contraintes pour encadrer l'ajustement du modèle aux données.

<b>Métabolite</b>	<b>LacZ</b>		<b>CNTF</b>	
	<b><math>D_{\text{intra}}</math> (<math>\mu\text{m}^2/\text{ms}</math>)</b>	<b>Rayon (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>D_{\text{intra}}</math> (<math>\mu\text{m}^2/\text{ms}</math>)</b>	<b>Rayon (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<i>NAA</i>	$0.371 \pm 0.010$	$0.54 \pm 0.21$	$0.373 \pm 0.012$	$0.43 \pm 0.16$
<i>Glutamate</i>	$0.464 \pm 0.004$	$0.91 \pm 0.16$	$0.435 \pm 0.010$	$0.43 \pm 0.15$
<i>Créatine</i>	$0.387 \pm 0.007$	$1.16 \pm 0.04$	$0.393 \pm 0.002$	$1.05 \pm 0.01$
<i>Taurine</i>	$0.472 \pm 0.006$	$1.57 \pm 0.05$	$0.490 \pm 0.005$	$1.57 \pm 0.05$
<i>Choline</i>	$0.318 \pm 0.006$	$1.01 \pm 0.04$	$0.321 \pm 0.003$	$1.21 \pm 0.02$
<i>Myo-Inositol</i>	$0.304 \pm 0.004$	$1.28 \pm 0.02$	$0.331 \pm 0.004$	$1.49 \pm 0.02$

L'augmentation du rayon des fibres dans lesquelles diffusent la choline (+20%) et le myo-inositol (+16%) est très nette, ainsi que la diminution du rayon des fibres dans lesquelles diffuse le NAA (-20%). L'ajustement du modèle (pour l'extraction du rayon) aux données du glutamate et du NAA est très dépendant de la fraction fixe : en laissant tous les paramètres libres,  $R_{\text{NAA}}(\text{LacZ})=1.94 \pm 0.22 \mu\text{m}$  ( $f=0.24$ ) ;  $R_{\text{NAA}}(\text{CNTF})=1.57 \pm 0.05 \mu\text{m}$  ( $f=0.18$ ) ;  $R_{\text{Glu}}(\text{LacZ})=1.81 \pm 0.10 \mu\text{m}$  ( $f=0.15$ ) ;  $R_{\text{Glu}}(\text{CNTF})=1.54 \pm 0.04 \mu\text{m}$  ( $f=0.13$ ). Pour respecter l'idée que la fraction fixe représente une petite partie du volume qu'occupent les métabolites (correspondant par exemple à la population mitochondriale), nous avons imposé  $f < 0.15$  et cela change drastiquement les résultats (Table 9-3). Néanmoins la variation relative du rayon entre le groupe CNTF et le groupe LacZ est la même pour le NAA, quelle que soit la contrainte sur la fraction.

Pour modéliser l'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion, nous avons utilisé le modèle décrit en §8.4 (Table 9-4), sans tenir compte du point acquis à  $t_d=53.2 \text{ ms}$ , où la dépendance au rayon et aux éventuelle structures à petite échelles (comme les épines dendritiques) est encore trop marquée (cf §8.5). L'ajustement aux données est donc réalisé entre  $t_d=253.2 \text{ ms}$  et  $t_d=2003.2 \text{ ms}$ .

**Table 9-4 :**  $N_{\text{branch}}$ ,  $L_{\text{segment}}$  et leur SD ainsi que  $D_{\text{intra}}$  extraits grâce au modèle décrit en §8.4 (Palombo et al., 2016). Les déviations standard de chaque paramètre seront calculées par analyse de Monte Carlo. Les

estimations des paramètres moyens sont susceptibles d'évoluer en travaillant sur les contraintes pour encadrer l'ajustement du modèle aux données.

<b>LacZ</b>					
<b>Métabolite</b>	$N_{\text{branch}} (\mu\text{m})$	$SD_{N_{\text{branch}}} (\mu\text{m})$	$L_{\text{segment}} (\mu\text{m})$	$SD_{L_{\text{segment}}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{intra}} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$
<i>NAA</i>	6.0	2.5	68	24	0.344
<i>Glutamate</i>	5.7	2.6	57	24	0.388
<i>Créatine</i>	5.5	3.5	65	28	0.381
<i>Taurine</i>	4.1	3.4	62	26	0.427
<i>Choline</i>	3.3	2.5	36	14	0.300
<i>Myo-Inositol</i>	4.2	2.5	43	14	0.300

<b>CNTF</b>					
<b>Métabolite</b>	$N_{\text{branch}} (\mu\text{m})$	$SD_{N_{\text{branch}}} (\mu\text{m})$	$L_{\text{segment}} (\mu\text{m})$	$SD_{L_{\text{segment}}} (\mu\text{m})$	$D_{\text{intra}} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$
<i>NAA</i>	7.3	2.4	66	24	0.340
<i>Glutamate</i>	5.6	2.5	68	24	0.405
<i>Créatine</i>	5.7	4.5	66	27	0.383
<i>Taurine</i>	4.5	3.4	61	25	0.433
<i>Choline</i>	3.9	2.5	45	14	0.300
<i>Myo-Inositol</i>	4.1	2.5	65	14	0.344

En calculant les longueurs moyennes des processus ( $N_{\text{branch}} \times L_{\text{segment}}$ ), la classification NAA ( $L_{\text{LacZ}}=405 \mu\text{m}$ ,  $L_{\text{CNTF}}=479 \mu\text{m}$ ), Glu ( $L_{\text{LacZ}}=326 \mu\text{m}$ ,  $L_{\text{CNTF}}=383 \mu\text{m}$ ) > Tau ( $L_{\text{LacZ}}=254 \mu\text{m}$ ,  $L_{\text{CNTF}}=275 \mu\text{m}$ ) > Ins ( $L_{\text{LacZ}}=180 \mu\text{m}$ ,  $L_{\text{CNTF}}=263 \mu\text{m}$ ), tCho ( $L_{\text{LacZ}}=120 \mu\text{m}$ ,  $L_{\text{CNTF}}=176 \mu\text{m}$ ) est retrouvée dans les deux groupes, en accord avec les premiers résultats obtenus (§8.4). La choline et le myo-inositol diffusent donc bien dans de petits compartiments, apparentés à un compartiment astrocytaire, par rapport au NAA et au Glutamate qui diffusent dans des compartiments avec des fibres plus longues, apparentées aux processus neuronaux. Les longueurs estimées pour la tCr ( $L_{\text{LacZ}}=356 \mu\text{m}$ ,  $L_{\text{CNTF}}=377 \mu\text{m}$ ) semblent un peu élevées. La tCr sort donc de cette classification pour les souris LacZ, mais son ADC est effectivement haut à longs  $t_d$ , plus que dans l'étude précédente. Les conditions d'acquisition ne sont pas tout à fait les mêmes, ce qui pourrait entraîner cette différence (cf Discussion de ce chapitre).

Notons l'augmentation des longueurs de fibre entre les CNTF et les LacZ, très similaires pour les métabolites appartenant supposément au même type de compartiment :



- + 46-47 % pour le myo-inositol et la choline
- + 6-8 % pour la taurine et la créatine
- + 18% pour le glutamate et le NAA

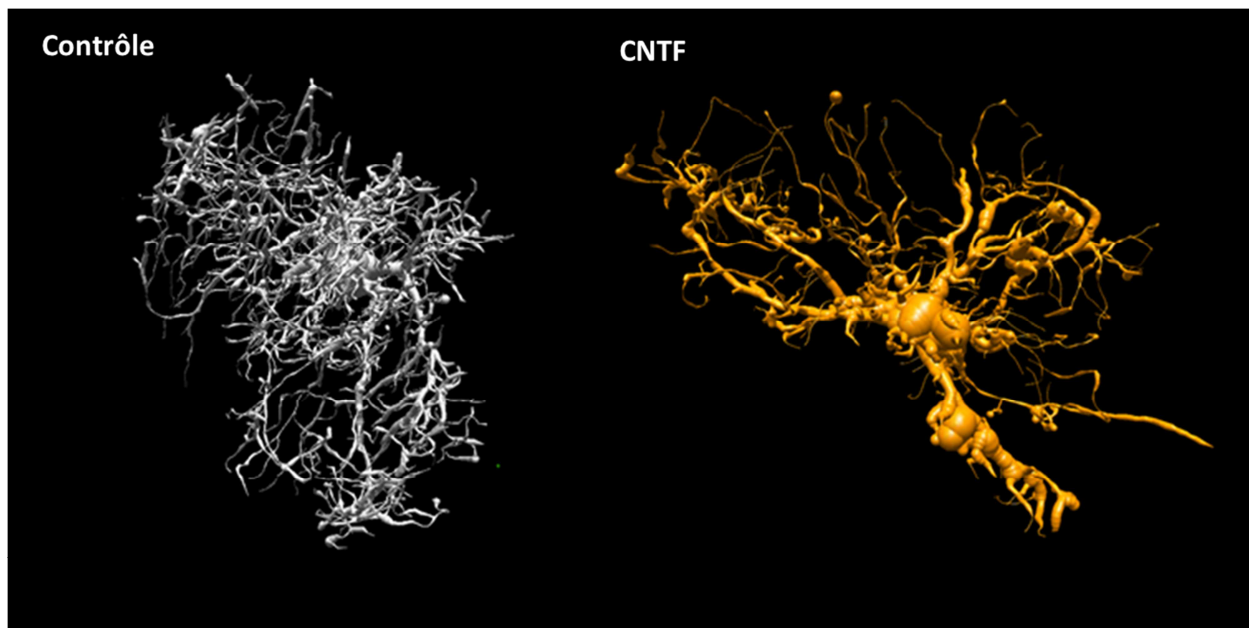
L'augmentation très forte de la longueur des fibres relatives à la choline et au myo-inositol sont en accord avec l'hypothèse d'activation astrocytaire.

## 9.6 Microscopie co-focale

Pour chaque groupe, 43 astrocytes du striatum de 4 souris ont été reconstruits à l'aide d'images acquises par microscopie co-focale à balayage laser par Edwin Hernandez-Garzon (Figure 9-10). Ces reconstructions lui ont permis d'évaluer le diamètre moyen et la longueur moyenne des processus astrocytaires pour chaque groupe (Table 9-5). Les processus des cellules sont décomposés en segments (comme pour la modélisation, cf §8.4). Le diamètre moyen est calculé en faisant la moyenne des diamètres de chaque segment pondéré par leur volume puisqu'en spectroscopie RMN, le signal mesuré pour les métabolites intracellulaires est proportionnel au volume de chaque segment dans lesquels ils diffusent. Cela permet de comparer le plus justement possible les estimations issues de la modélisation avec les estimations issues de la microscopie. L'utilisation de la GFP pour quantifier la morphologie des astrocytes est préférée au marquage immunohistochimique de la GFAP pour cette étude : nous voulons être sûrs d'être sensible à la morphologie de l'astrocyte dans toute sa complexité. D'une part, le marquage immunohistochimique de la GFAP dépend du niveau d'expression de cette protéine, fortement surexprimée en condition d'activation astrocytaire, ce qui peut induire un premier biais sur l'estimation de la morphologie. D'autre part c'est une protéine du cytosquelette (filament intermédiaire), elle n'occupe donc pas tout le volume du cytosol, contrairement à la GFP.

Table 9-5 : Diamètre, longueur et volume moyens issus des reconstructions d'astrocytes par microscopie co-focale à balayage laser (manque déviation standard pour la longueur).

	<b>Diamètre (µm)</b>	<b>Longueur (µm)</b>	<b>Volume (µm<sup>3</sup>)</b>
<b>LacZ</b>	1.414 ± 0.092	49.0 ± 3.28	1348 ± 945
<b>CNTF</b>	1.895 ± 0.082	56.3 ± 3.15	1558 ± 856
<b>Δ%</b>	+ 34%	+ 14%	+ 16%



**Figure 9-10** : Astrocytes représentatifs du groupe LacZ (gauche) et du groupe CNTF (droite). Reconstruction 3D issue d'images acquises en microscopie co-focale à balayage laser © Edwin Hernandez-Garzon, MIRCen.

## 9.7 Discussion

### 9.7.1 Concentrations des métabolites selon les régions

L'étude de spectroscopie dans les petits voxels donne une indication sur le niveau basal des métabolites selon la région à laquelle ils appartiennent (Figure 9-6).

En condition contrôle (groupe LacZ), plusieurs variations sont notables :

- Le doublet de l'alanine (autour de 1.46-1.47 ppm) est plus marqué dans le striatum,
- Les concentrations de glutamate et de NAA sont plus basses dans le striatum,
- La concentration de lactate est plus importante dans le striatum,
- La taurine est beaucoup plus concentrée dans le striatum que dans le thalamus.

Ces observations sont parfaitement en accord avec l'étude de Tkac et al. (2004) qui rapporte les concentrations de 17 métabolites dans 4 régions du cerveau de la souris à 9.4 T : le cortex, l'hippocampe, le striatum et le cervelet. Pour l'alanine, le NAA, le glutamate, le lactate et la taurine, ces concentrations sont effectivement significativement différentes dans le striatum par rapport aux autres régions dans l'étude de Tkac et al. Les ratios Cr/PCr sont inversés dans les deux régions.

En conditions CNTF, la concentration de plusieurs métabolites varie comme nous l'avons décrit en 9-d. Dans le striatum, l'augmentation de la phosphocréatine pourrait indiquer un stress métabolique compensé par l'augmentation de la phosphocréatine comme réserve d'ATP. Cela a été proposé au laboratoire dans le cadre d'une étude en  $^{31}\text{P}$  pour un modèle rat de la maladie de Huntington (BACHD) (Tiret et al., 2016). Dans le thalamus, la diminution de la concentration de NAA s'associe à diminution de la concentration de glutamate, alors que dans le striatum, le glutamate est stable, ce qui souligne à nouveau l'hétérogénéité de l'action du CNTF sur les différentes structures. La chute du NAA est en général associée à une perte ou un stress neuronal. L'augmentation de la concentration de myo-inositol est en général observée en condition d'activation astrocytaire (§1.3).

### 9.7.2 Couplage spectroscopie/spectroscopie de diffusion

*L'approche décrite initialement dans ce paragraphe n'est pas réellement valable, car nous n'avons pas connaissance du nombre de processus issus des corps cellulaires, paramètre qui n'a pas d'influence sur la modélisation.*

Le NAA et le myo-Inositol sont des osmolites des neurones et astrocytes (respectivement, cf §1.3). Si le volume des cellules dans lesquels ils sont contenus varient et qu'ils gardent une concentration cellulaire stable, alors la concentration apparente à l'échelle du voxel augmente avec le volume des cellules concernées. La variation de volume est calculée à partir des rayons et longueurs moyens (R et L) issus de la modélisation pour les deux groupes, en considérant des volumes moyens de cylindres  $(\frac{\pi R_{CNTF}^2 L_{CNTF}}{\pi R_{LacZ}^2 L_{LacZ}})$ , l'analyse est donc assez simpliste.

La concentration du myo-inositol augmente de 92% et le volume des fibres dans lesquelles il diffuse augmente de 96% d'après le diamètre et la longueur. La concentration du NAA chute de 20% et le volume des fibres dans lesquelles il diffuse diminue de 24%.

Pour le reste des métabolites, qui ne sont pas caractérisés comme des osmolites, la corrélation est moins évidente. Par exemple pour les composés cholinergiques, la concentration varie peu d'un groupe à l'autre (même si la tendance est plutôt à la hausse pour le groupe CNTF) et une augmentation de volume de 111% est enregistrée.

Les quantités d'osmolites pourraient donc être partiellement caractéristiques de la morphologie des cellules. Cela a déjà été souligné pour le NAA, dont la diminution de concentration est associée à la mort neuronale dans la plupart des études, mais également associé à l'atrophie des neurones dans (Ferrante et al., 2000 ; Jenkins et al., 2000, 2005), en plus d'éventuels dérèglements métaboliques. L'augmentation de

la concentration de myo-Inositol est régulièrement associée à l'activation astrocytaire (§1.3) et à une surexpression de la GFAP, mais sans que cela ait été directement corrélé à l'augmentation du volume des astrocytes.

### 9.7.3 Hautes pondérations en diffusion

- Lactate

Pour la plupart des métabolites, les différences entre le groupe CNTF et le groupe LacZ sont assez subtiles (même si significatives pour l'Ins, les tCho et le NAA). L'atténuation du signal du lactate est drastiquement différente d'un groupe à l'autre (Figure 9-11-A).

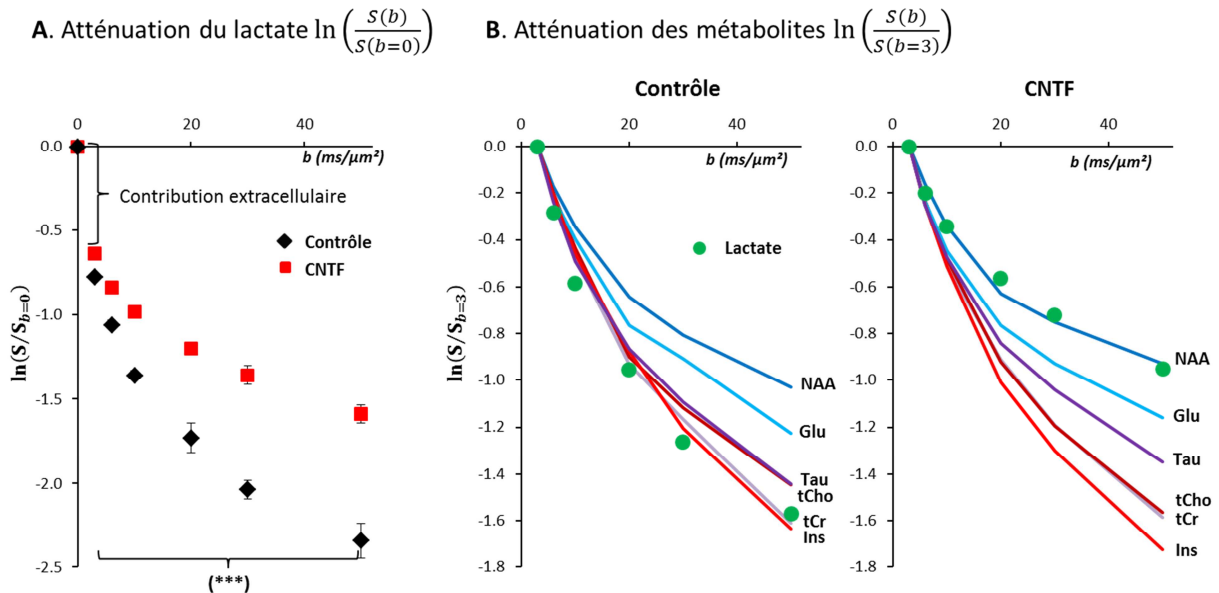
Les interprétations concernant les variations de concentrations de lactate sont toujours délicates quand les animaux sont sous anesthésie, et d'autant plus sous isoflurane. L'étude de Boretius et al. (2013) montre une nette augmentation de la concentration de lactate sous anesthésie à l'isoflurane dans le cerveau de souris et une corrélation claire entre le niveau de lactate et la présence de l'anesthésique ou non : la réponse de la concentration de lactate à la variation du niveau d'isoflurane est de l'ordre de quelques minutes. La concentration des autres métabolites varie également, mais dans des proportions beaucoup moins importantes.

L'étude de Valette et al. (2007) montre que l'ADC des métabolites principaux augmente quand l'isoflurane passe de 1 à 2%, avec un effet seuil à 1.5% (stage de Master II de Chloé Najac). Nous avons toujours fait attention à garder une dose d'isoflurane la plus basse possible (souvent <1.3%). Cependant, le lactate étant à la fois dans le milieu extracellulaire et intracellulaire, les interprétations des données de spectroscopie de diffusion du lactate seules sont indirectes et multifactorielles, donc plus compliquées que pour les métabolites intracellulaires.

Néanmoins, les souris des deux groupes ont été anesthésiées dans les mêmes conditions : la variation sur l'atténuation du signal du lactate tient donc d'une différence intergroupe, même si cette différence n'existe ou n'est détectable qu'en réponse à l'anesthésique.

L'atténuation du signal du lactate est donc beaucoup moins forte dans le groupe CNTF. Le lactate étant assez concentré dans le milieu extracellulaire (§1.3), la chute de signal marquée entre  $b=0.020$  et  $b=3.020$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  est probablement en partie liée à la contribution extracellulaire de lactate. Afin de diminuer l'effet de cette contribution et pour pouvoir comparer le lactate aux autres métabolites intracellulaires, nous avons normalisé le signal à toutes les valeurs de  $b$  par le signal à  $b=3.020$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  (plutôt que de normaliser par le signal à  $b=0.020$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ ). La figure 9-11-B montre la comparaison entre l'atténuation du signal de tous les métabolites et du lactate. En condition contrôle, l'atténuation du signal du lactate est

très proche de celle de la tCr ou de l'Ins, marquant éventuellement une tendance à se trouver plutôt dans les astrocytes que dans les neurones. Dans le groupe CNTF, le lactate a un comportement diffusif très proche du NAA. Le lactate pourrait donc se situer davantage dans les neurones chez le groupe CNTF que le groupe LacZ.



**Figure 9-11 :** Atténuation du signal du lactate aux hautes valeurs de b. L'atténuation massive de signal observée entre  $b=0.020$  et  $b=3.020$  ms/μm<sup>2</sup> est probablement liée à une contribution extracellulaire (A). Pour y être moins sensible l'atténuation du signal est normalisées pour tous les métabolites par le signal obtenu à  $b=3.020$  ms/μm<sup>2</sup> (B).

Pour que cette hypothèse soit vérifiée, il faudrait d'une part que les astrocytes produisent moins lactate et/ou d'autre part que les neurones en produisent davantage.

L'étude d'Escartin et al. (2007) s'intéresse à la réponse métabolique des astrocytes en présence de CNTF dans le striatum de rat. Une diminution de l'absorption de glucose (vérification par [<sup>18</sup>F]FDG) ainsi que de l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), qui catalyse la réaction du lactate en pyruvate et vice-versa, est observée. Bien que l'expression du transporteur du glucose à la BHE et dans les astrocytes, GLUT1, ne soit pas altérée, une étude récente de Zimmer et al. (2017) montre que l'absorption de [<sup>18</sup>F]FDG est au moins en partie astrocytaire. Ces observations peuvent suggérer une diminution de l'activité glycolytique des astrocytes, donc une diminution de la production de lactate dans les astrocytes. L'activité mitochondriale (évaluée par l'activité de l'enzyme COX) ne semble pas altérée, les mitochondries des astrocytes activés par le CNTF (et des neurones) utilisent donc probablement une autre

source d'acetyl-CoA que le pyruvate. La  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH) et SCOT sont significativement surexprimées dans les astrocytes activés par le CNTF, et sont impliquées dans la métabolisation des corps cétoniques (acétylacétate, acétone et  $\beta$ -hydroxybutyrate) menant à la production d'acetyl-CoA. Notons que la contribution supplémentaire de thréonine ou de  $\beta$ -hydroxybutyrate (ou des deux) au spectre des macromolécules (Figure 9-5) s'accorde avec ces observations. La BDH, surexprimée dans les astrocytes activés, contient notamment des séquences peptidiques riches en thréonine et en sérine (Yamaguchi et al., 1986). Bien que la contribution de la sérine (pics à 3.83, 3.93 et 3.97 ppm) soit peu visible sur le spectre des macromolécules (à part peut-être une petite contribution à 3.97 ppm), le spectre relatif au striatum du groupe CNTF de la figure 9-6-A affiche des contributions supplémentaires aux résonances correspondantes de la sérine. Par ailleurs, le  $\beta$ -hydroxybutyrate semble être un soutien efficace au métabolisme mitochondrial (Tieu et al., 2003), ce qui pourrait compenser la baisse de l'activité glycolytique. Le transporteur astrocytaire des corps cétoniques, MCT1, est surexprimé dans les astrocytes. Le métabolisme astrocytaire utilise donc davantage les voies cétoniques en cas d'activation par le CNTF.

Une quantification de l'expression de GLUT3 pourrait donner une indication sur l'absorption de glucose par les neurones, mais en cas d'activation des astrocytes par le CNTF, les changements métaboliques principaux devraient avoir lieu plutôt dans les astrocytes. Ces derniers sont capables d'envoyer les corps cétoniques qu'ils ont produits à partir des acides gras, dans les neurones (Guzman et Blazquez, 2001). Si les corps cétoniques sont produits davantage dans les astrocytes, leur différence de concentration entre astrocytes et neurones pourrait stimuler leur transport des astrocytes vers les neurones. Il est donc possible que les mitochondries neuronales utilisent aussi davantage la voie cétonique. Si l'activité glycolytique des neurones est stable, le lactate pourrait être d'autant plus concentré dans les neurones.

Le lactate pourrait donc effectivement être davantage concentré dans les neurones (par rapport à sa concentration astrocytaire) dans le groupe CNTF que dans le groupe LacZ.

- Population fixe de NAA

Aux hautes valeurs de pondérations en diffusion, l'atténuation du signal du NAA est plus faible pour le groupe des CNTF (Figure 9-8), mais ce n'est pas le cas pour le glutamate (à part une tendance pour le point à  $b=50$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ). La première hypothèse est que diamètre des fibres où diffuse le NAA diminue. Une autre interprétation possible est que cette atténuation diminuée du signal est liée à une augmentation de la fraction fixe de NAA (§8.3), bien que la modélisation des cylindres infinis ne renforce pas cette hypothèse. Mais lorsqu'on ajoute une fraction fixe, l'ajustement du modèle à l'atténuation du signal du NAA et du Glu est instable (les déviations standards sur l'estimation des paramètres, notamment du rayon, sont importantes), ce qui ne permet pas de conclure fermement.

- Différence entre microscopie et modélisation pour les astrocytes

Les valeurs de diamètres issues de la microscopie sont du même ordre de grandeur et plutôt assez proches. Elles évoluent bien dans le même sens et dans des proportions assez proche entre le groupe CNTF et le groupe LacZ (+34% et +20%) (Table 9-6).

Table 9-6 : Diamètres issus de la microscopie co-focale à balayage laser et de la modélisation (intervalle provenant de l'atténuation du signal des tCho et de l'Ins) des processus astrocytaires pour les deux groupes

	<b>Microscopie</b>	<b>Modélisation</b>
<b>LacZ</b>	1.414 $\mu\text{m}$	2.0-2.6 $\mu\text{m}$
<b>CNTF</b>	1.895 $\mu\text{m}$	2.4-3.0 $\mu\text{m}$

L'estimation par la microscopie donne des rayons légèrement plus petits. D'une part cette différence est probablement liée à surestimation du diamètre associée au modèle des cylindres infinis appliqué aux hautes valeurs de pondération en diffusion (§8.5) : les processus astrocytaires qui présentent une petite complexité liée à des structures secondaires (feuillettes astrocytaires) voient leur rayon fortement surestimé par ce modèle (Palombo et al., 2017). D'autre part, l'augmentation de diamètre est de 34% par microscopie chez les CNTF et de 16 à 20% par la modélisation. A nouveau, cette différence d'estimation peut provenir d'une différence de complexité : les astrocytes pourraient, en devenant hypertrophiques, perdre une partie de leur complexité liée aux structures secondaires, le S/V diminuerait. Le modèle des cylindres infinis estimerait alors plus fidèlement le rayon des processus astrocytaires du groupe CNTF que du groupe contrôle. Cependant, la limite de résolution optique de la microscopie laisse la possibilité d'une marge d'erreur sur la mesure : il n'y a pas de « vérité absolue ».

- Macromolécules

L'atténuation du signal des macromolécules est plus monoexponentielle dans cette étude que dans le chapitre 6 (§6.3). Par rapport à cette première étude, la différence provient probablement du fait que le spectre de macromolécules inséré dans la base LCModel a été acquis avec une meilleure méthode (§5.3). Le résidu de métabolites devrait être encore plus négligeable dans cette étude : l'atténuation du signal des macromolécules n'est pas influencée par la présence de résidus de métabolites dans sa base et est davantage monoexponentielle, comme suggéré par Pfeuffer et al. (2000).

#### **9.7.4 DTI**

Nous avons également vérifié, directement autour du site d'injection dans chaque hémisphère, si une différence était mesurable en DTI avec une séquence classique. Ni l'ADC moyen, ni la fraction anisotrope ne présentent de différences significatives entre le groupe CNTF et le groupe LacZ (valeurs moyennes calculées sur les 10 souris et les deux hémisphères, Table 9-7).

Table 9-7 : Coefficient de diffusion apparent moyen et fraction anisotrope mesurés dans le striatum des souris des groupes CNTF et LacZ.

	<b>CNTF</b>	<b>LacZ</b>	<i>p-value</i>
<b>Mean ADC</b> ( $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ )	0.55 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.02	0.14
<b>FA</b>	0.27 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.03	0.17

### 9.7.5 Différences avec les données présentées en §6.4

L'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion pour les souris contrôle est légèrement différente des résultats présentés en §6.4. Le groupe de souris utilisé en §6.4 est beaucoup plus hétérogène en âges, et les souris sont globalement plus vieilles de plusieurs mois par rapport au groupe LacZ (souris âgées de 3-3.5 mois au moment des expériences). La suppression de l'eau, la base de macromolécules ainsi que les analyses LCModel sont différentes dans les deux études, et ont été améliorées pour cette partie. La tendance des résultats reste équivalente, sauf pour la créatine, dont l'ADC élevé au-delà de  $t_d=1000$  ms conduit probablement à une surestimation de la longueur des fibres dans lesquelles elle diffuse. Le signal à 3.9 ppm de la créatine est atténué par les impulsions de saturation appliquées pour supprimer l'eau. Entre les données présentées en §6.4 et dans cette partie, d'une part une impulsion pour supprimer l'eau a été ajoutée à la fin du TM et d'autre part la bande passante utilisée pour supprimer l'eau est passée de 120 Hz à 250 Hz, ce qui confère une bien meilleure suppression de l'eau, mais aussi probablement une atténuation plus forte du signal de la tCr à 3.9 ppm.

### 9.8 Conclusion et publications associées

Le modèle d'activation astrocytaire induit sur souris par le transfert de gène CNTF présente bien une hypertrophie des astrocytes que nous avons pu quantifier *ex vivo* par microscopie co-focale.

Le comportement diffusif des composés cholinergiques reflète partiellement l'activation astrocytaire, mais la tendance sur les données brutes est moins significative que pour le myo-inositol et leur concentration évaluée en spectroscopie est parfaitement stable : les composés cholinergiques diffusent manifestement principalement dans les astrocytes, mais n'en sont probablement pas un osmolyte.



Le myo-inositol semble être le meilleur marqueur astrocytaire dans cette étude. D'une part son comportement diffusif sans modélisation varie significativement, dans le sens de compartiments plus grands pour le groupe CNTF. D'autre part l'augmentation de sa concentration mesurée en spectroscopie correspond probablement très partiellement à une augmentation liée à l'augmentation du volume de la cellule hôte.

L'augmentation des longueurs et rayons moyens des prolongements astrocytaires calculée par modélisation appliquée aux données de diffusion du myo-inositol et des composés cholinergiques est en accord avec la variation des paramètres mesurés en microscopie.

La spectroscopie de diffusion est donc sensible aux variations de morphologie d'un type cellulaire, à condition qu'un ou plusieurs métabolites y diffusent préférentiellement (tCho et Ins pour les astrocytes par exemple).

Enfin, la bonne qualité de la base de macromolécules permet d'obtenir des informations sur la surexpression potentielle d'une protéine (ex : thréonine dans la  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase) et surtout permet de quantifier de manière plus fiable l'atténuation du signal du lactate. Le lactate n'est pas associé à un type cellulaire spécifique, mais il est impliqué dans un grand nombre de processus liés au métabolisme et probablement à la plasticité cérébrale. Obtenir davantage d'informations sur une compartimentation préférentielle en conditions pathologiques présente un intérêt majeur pour la recherche sur les maladies neurodégénératives.

Ces travaux ont fait l'objet de communications orales au workshop de spectroscopie RMN organisé par l'ISMRM à Constance en 2016 ainsi qu'au 25<sup>ème</sup> congrès annuel de l'ISMRM et feront l'objet d'une publication écrite (en préparation).

## **Publication associée**

### *Communication orale*

Ligneul, C., Palombo, M., Hernandez-Garzon, E., Guillermier, M., Bernier, S., Ceyzeriat, K., ... Valette, J. (2017). Probing alterations of cellular metabolism and structure in CNTF-induced mouse model of astrocytic activation using in vivo MRS and diffusion-weighted MRS. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 25* (p. 0410). doi:10.1002/mrm.26217

## CHAPITRE 10

### Application à un modèle souris de la maladie de Huntington (R6/1)

---

#### 10.1 La maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative, entièrement génétique, à transmission autosomale dominante : il suffit d'un allèle muté pour développer la maladie. Elle engendre une perte massive de neurones d'abord dans le striatum puis dans le cortex. Les symptômes sont moteurs (chorée, dystonie, bradykynésie), cognitifs (fonctions exécutives altérées : mémoire de travail, attention etc) et psychiatriques (dépression, anxiété, apathie). Elle est liée à une répétition anormale du triplet CAG sur l'exon 1 du gène codant pour la huntingtine (chromosome 4). En conditions normales, ce triplet est répété au maximum 35 fois. Répété 40 fois et plus, la pénétrance de la MH est complète. Plus le triplet est répété, plus les symptômes sont sévères et l'âge où la maladie se déclare, jeune. Les formes les plus sévères (forme juvénile) comptent plus de 60 répétitions du triplet CAG (Ross et Tabrizi, 2011). Lorsque le gène est muté, la protéine exprimée est mal conformée : elle présente une extension près de la partie N-terminale riche en glutamine, traduction du codon CAG (The Huntington's Disease center Research Group, 1993) et dite polyglutamine. Elle forme alors des agrégats intraneuronaux (DiFiglia et al., 1997), mais leur toxicité est matière à débat (Arrasate et al., 2004). L'absence ou la diminution du taux de huntingtine sauvage est aussi à la source de la neurodégénérescence (Cattaneo et al., 2005). La huntingtine sauvage est neuroprotectrice et interagit avec de nombreuses protéines. Des altérations transcriptionnelles et mitochondriales ont été mises en évidence dans la MH (Quintanilla et Johnson, 2009).

D'un point de vue morphologie cellulaire, les neurites sont dystrophiques (DiFiglia et al., 1997) et une activation astrocytaire croissante est observée avec l'évolution de la maladie (Faideau et al., 2010). Une activation de la microglie pré-symptomatique (Tai et al., 2007) et se développant au cours de la MH ont également été constatées (Sapp et al., 2001).

#### 10.2 Le modèle R6/1

Les lignées de souris R6 ont été conçues avec des fragments tronqués du gène codant pour la huntingtine mutée (Mangiarini et al., 1996). Les souches R6/1 et R6/2 sont les plus étudiées. Elles expriment l'exon 1 du gène de la huntingtine (3% du gène total), avec en moyenne 115 répétitions du triplet CAG pour les R6/1 et 150 pour les R6/2. La traduction de l'exon 1 du gène muté des R6/1 donne une protéine d'environ 70 kDa (Davies et al., 1997). Le phénotype des R6/2 est très sévère, les symptômes moteurs apparaissent dès 6 semaines et la mort survient entre 12 et 18 semaines. Les R6/1 ont un phénotype plus progressif. Le

modèle a été initialement décrit comme ne présentant pas de perte neuronale (Levine et al. 2004), mais avec des symptômes moteurs dès 4 mois et une neurotransmission défectueuse à 16 semaines également (marquage immunohistochimique DARPP-32, Naver et al., 2003), Des altérations de l'arbre dendritique ont été mises en évidence (Spires et al., 2004) à 8 mois. Des études plus récentes notent des pertes neuronales par rapport aux souris contrôles dès 4 mois (Bayram-Weston et al., 2012) et à 19 semaines (mais à densité de neurones constante, Rattray et al., 2013) et 7 mois (Harrison et al., 2013) dans d'autres études. L'activité astrocytaire n'est pas plus importante que chez les souris contrôles dans le striatum (marquage immunohistochimique de la GFAP, Bayram-Weston et al., 2012) et est globalement peu marquée dans la lignée R6 (Schwab et al., 2010). Le volume du striatum est significativement plus faible que chez les souris contrôles à 17 semaines (~15-20%, Rattray et al., 2013).

L'atteinte cellulaire de ce modèle est donc principalement neuronale. Les expériences de spectroscopie de diffusion telles que présentées dans le chapitre 9 pourraient permettre de caractériser de façon non-invasive les altérations morphologiques et métaboliques de ce modèle.

### **10.3 Méthodes spécifiques**

#### **10.3.1 Protocole expérimental général**

Pour étudier le modèle transgénique R6/1 de la MH, trois groupes de souris âgées d'environ 20 semaines ont été constitués :

- Groupe « R6/1 » (10 souris). Les souris sont des B6-R61 (The Jackson Laboratory).
- Groupe « WT » (11 souris). Les souris sont les littermates des B6-R61 du groupe R6/1. Pendant une expérience, une souris respirait avec beaucoup de difficultés, l'acquisition a donc été arrêtée prématurément pour ne pas la perdre, et une autre souris a été scannée pour acquérir les données manquantes.
- Groupe microscopie. 2 souris B6-R61 et 2 souris littermates ont été injectées avec des lenti-GFP ciblant les astrocytes et des lenti-dsRed ciblant les neurones.

2 souris du groupe R6/1 et du groupe WT ont été perfusées à la fin des expériences de RMN pour effectuer des marquages immunohistochimiques avec DARPP-32 (neurotransmission), NeuN (quantification de la perte neuronale) et GFAP (activation astrocytaire).

### 10.3.2 Protocole expérimental des expériences de RMN

Les méthodes sont exactement semblables à celles décrites en §9.2.2. Pour améliorer le signal à bruit à  $t_d=1000$  ms et diminuer la variabilité, le nombre de répétitions pour chaque acquisitions a été modifié comme suit (Table 10-1) :

Table 9-1 : Paramètres des acquisitions à temps de diffusion longs.

$t_d$ (ms)	TM (ms)	TR (ms)	$b_0$ (ms/ $\mu\text{m}^2$ )	Nombre de répétitions
253.2	250	2200	0.100	128
503.2	500	2500	0.200	128
1003.2	1000	3000	0.300	256
1503.2	1500	3500	0.450	384
2003.2	2000	4000	0.600	512

### 10.3.3 Observations physiologiques

La différence de poids entre les groupes est significative dès leur 12<sup>ème</sup> semaine. Entre la semaine 12 et la semaine 18, la prise de poids chez les WT et la perte de poids chez les R6/1 sont significatives (Table 10-2).

Table 10-2 : Masse corporelle des groupes WT et R6/1 âgés de 12 et 18 semaines. Valeur statistique, donnée pour la différence entre les moyennes calculées sur la ligne ou la colonne correspondante (test de Student) : (\*\*\*)  $p$ -value < 0.001 ; (\*\*)  $p$ -value < 0.01.

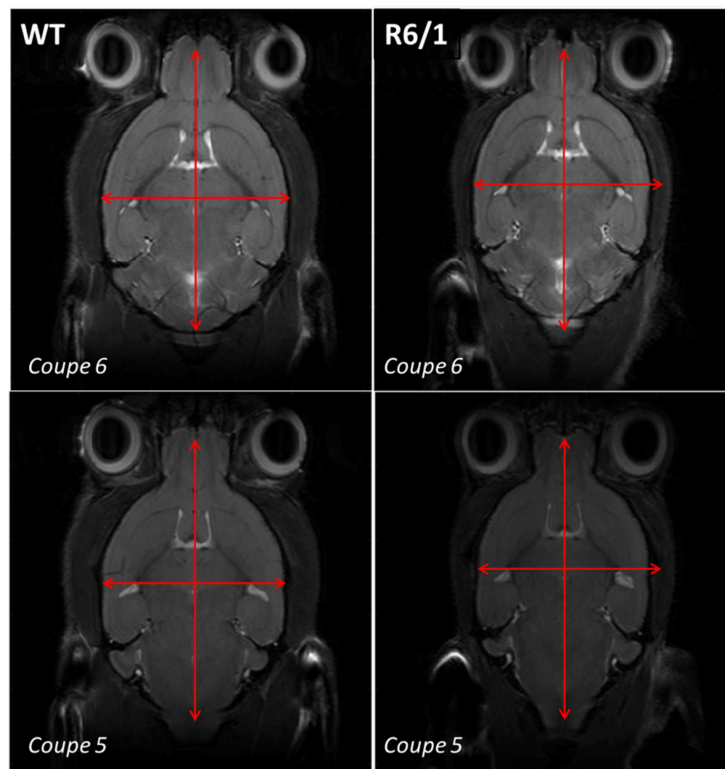
Semaine	S12 (**)	S18 (***)
WT (***)	26.6 $\pm$ 2.0 g	28.8 $\pm$ 1.8 g
R61 (***)	23.6 $\pm$ 0.9 g	22 $\pm$ 0.9 g

Quelques observations comportementales qualitatives sur le groupe R6/1 sont notables juste en regardant leur activité basale en cage. Les souris du groupe R6/1 urinent plus que les contrôles. Cette incontinence urinaire est également observée chez les souris R6/2 (Davies et al., 1997). Elles montrent un comportement plus anxieux (toilette constante et perte de poils) et semblent éprouver une souffrance (souvent dos voussé et yeux mi-clos). Elles ne tiennent pas la position debout et se déplacent plus lentement que les littermates.

Lorsqu'elles étaient trop grasses (>30 g), les WT supportaient mal l'anesthésie pendant 5h30 et les expériences ont parfois dues être interrompues avant la fin car leur respiration s'arrêtait ou se faisait par hoquets (3 WT où la spectroscopie dans les petits voxels spécifiques n'a pas pu être réalisée, dont une où il manquait la moitié des répétitions pour le point à  $t_d=2000$  ms). Les souris étaient donc pesées avant l'expérience pour minimiser ce risque.

## 10.4 Profil spectroscopique

### 10.4.1 Voxel et striatum



**Figure 10-1:** exemples de deux coupes successives d'images anatomiques d'une souris du groupe WT (gauche) et d'une souris du groupe R6/1 (droite). Pour chaque coupe, les flèches ont les mêmes dimensions et illustrent une atrophie générale des cerveaux des souris du groupe R6/1.

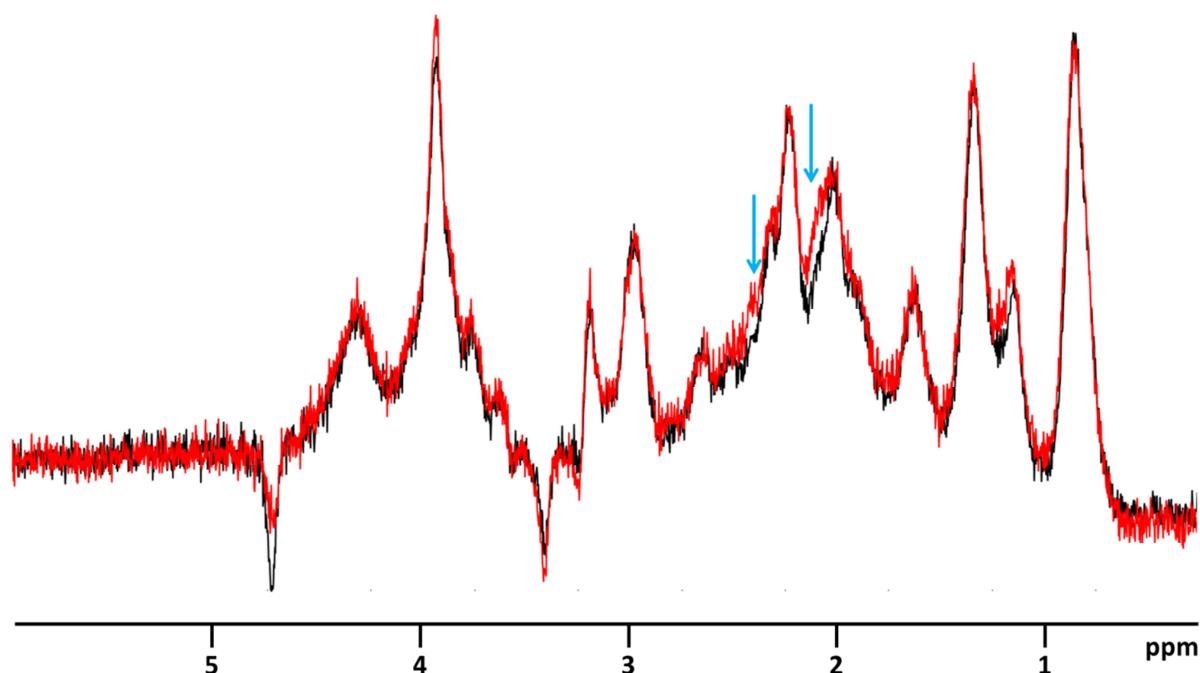
Le voxel principal de 56  $\mu$ l et les voxels spécifiques de 8  $\mu$ l sont les mêmes qu'au chapitre 9 (Figure 9-4).

Table 10-3 : Volume du striatum et du striatum contenu dans le voxel de 56  $\mu$ l mesurés à partir d'images anatomiques pondérées en  $T_2$  (5 souris par groupe), à 20 semaines.

	<b>WT</b>	<b>R61</b>	<i>p value</i>
<b>Volume du striatum (μL)</b>	28.3 ± 1.4	22.6 ± 0.8	0.002
<b>Volume du striatum dans le voxel de 56 μl (μL)</b>	19.0 ± 0.8	16.0 ± 0.9	0.008
<b>% dans le voxel</b>	34.0 ± 1.4	28.5 ± 1.7	

Une différence significative de volume du striatum existe entre le groupe WT et le groupe R6/1 (~20%) (Table 10-3), proche de celle mesurée par Rattray et al. (2013) à 17 semaines. En conséquence, le volume de striatum compris dans le voxel de 56 μl est lui aussi significativement plus faible en proportion dans le groupe R6/1. Nous n'avons pas quantifié le volume des autres structures (ventricules, thalamus, septum), cependant cette atrophie ne semble pas être associée à une augmentation du volume des ventricules (non visible à l'œil). Comme le cerveau des R6/1 est moins développé que leurs littermates (visible à l'œil et en accord avec les mesures de Rattray et al., 2013), ce sont probablement les autres structures (thalamus et cortex notamment) qui compensent cette atrophie au sein du voxel de 56 μl (Figure 10-1).

#### 10.4.2 Les macromolécules



**Figure 10-2** : Spectre de macromolécules, résultante de la somme sur les groupes entier pour le groupe WT (noir) et le groupe R61 (rouge). Les flèches bleues pointent la contribution supplémentaire au spectre de macromolécules des R6/1 de la glutamine, acide aminé très présent dans la huntingtine mutée. Avant

intégration dans la base LCModel, une SVD a été effectuée sur le tCr résiduelle à 3.9 ppm et sur la contribution négative de taurine.

Le spectre des macromolécules est assez similaire pour les deux groupes à l'exception de contributions supplémentaires autour de 2.1 et 2.4 ppm pour le groupe des R6/1 (Figure 10-1), correspondant vraisemblablement à de la glutamine. La huntingtine mutée étant très riche en glutamine et présente ubiquitairement dans le cerveau, cette contribution de glutamine au spectre des macromolécules des R6/1 est plutôt logique. Autour de 1.2-1.3 ppm, de la thréonine ou du  $\beta$ -hydroxybutyrate pourrait contribuer au spectre.

### 10.4.3 Voxels de 8 $\mu$ l

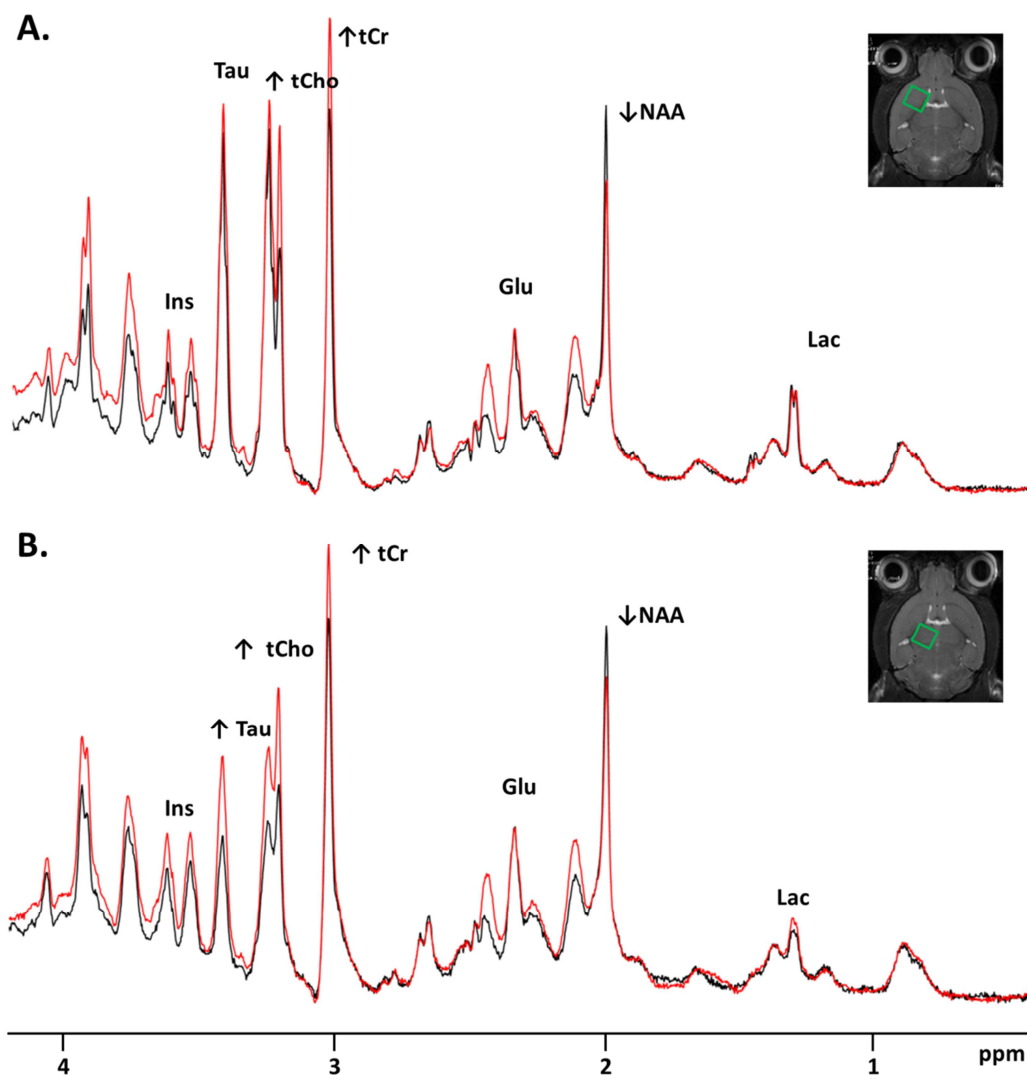
La spectroscopie a été réalisée sur les voxels spécifiques de 8  $\mu$ l sur l'ensemble des souris R6/1 et sur 8 souris WT. La figure 10-3 représente les moyennes de tous les spectres individuels pour chacun des phénotypes.

Dans le striatum et le thalamus, le profil spectroscopique est très similaire :

- Forte augmentation de la concentration de créatine totale (21 % dans le striatum, aire sous le pic)
- Forte augmentation de la concentration des composés cholinergiques
- Forte augmentation de la concentration de la glutamine
- Augmentation de la concentration de taurine, notamment dans le thalamus. La conclusion est moins nette dans le striatum où la concentration basale est beaucoup plus élevée (problème inverse par rapport aux groupes CNTF et LacZ (Figure 9-A&B)).
- Forte baisse de la concentration de NAA

L'alanine, détectable dans le striatum, semble avoir une concentration plus faible dans le groupe R6/1. Les concentrations de lactate, de glutamate et de myo-inositol semblent stables. En s'appuyant sur la résonance à 0.9 ppm, les macromolécules sont parfaitement stables dans le striatum.

Le striatum et le thalamus sont donc affectés par la huntingtine mutée.



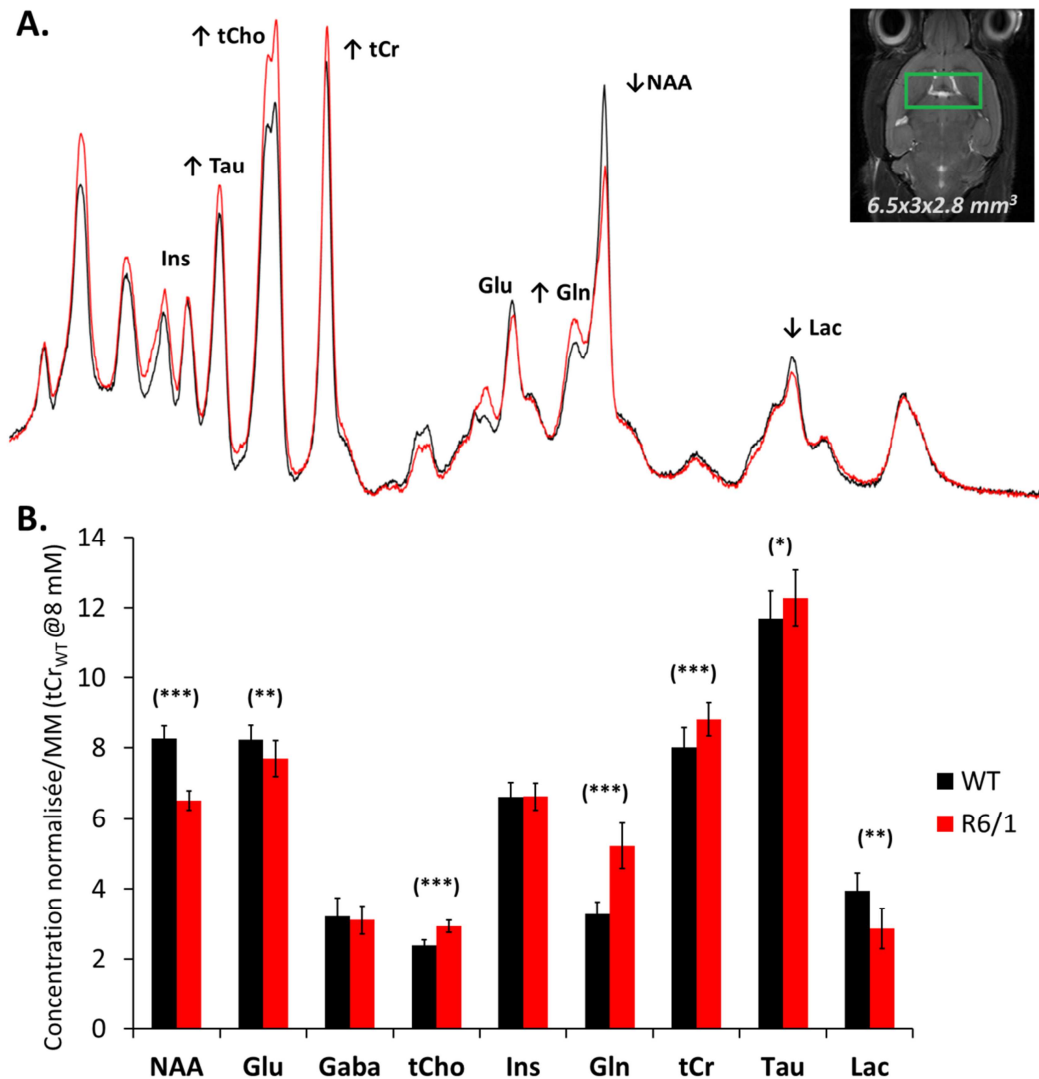
**Figure 10-3** : Somme réalisée sur 6 spectres acquis dans le striatum avec la séquence LASER (TE=20 ms) (A) ou dans le thalamus (B) pour le groupe WT (noir) ou R6/1 (rouge).

#### 10.4.4 Voxel de 56 $\mu$ l

A nouveau, pour pouvoir associer les résultats obtenus en spectroscopie de diffusion aux variations de concentrations, il est nécessaire de s'intéresser à leur variation dans le même voxel de 56  $\mu$ l.

Considérant l'augmentation importante de la concentration de créatine totale dans les voxels spécifiques de 8  $\mu$ l, il n'est pas étonnant que la concentration de créatine totale augmente dans le voxel de 56  $\mu$ l (Figure 10-4-A) : la somme de tous les spectres obtenus à  $b=0.020$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup> pour chaque groupe permet d'identifier les éléments stables du spectre d'un groupe à l'autre.





**Figure 10-4 :** (A) Somme réalisée sur l'ensemble des 10 spectres acquis à  $b=0.020 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la STELASER pour le groupe WT (noir) ou le groupe R6/1 (rouge) (B) Concentrations normalisées par la concentration de macromolécules moyenne (puis concentrations calibrées avec une concentration de tCr à 8 mM pour le groupe WT pour la visualisation). Les concentrations brutes avant normalisation sont les concentrations absolues issues de l'analyse LCModel effectuée sur chaque spectre acquis à  $b=0.020 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour les deux groupes. Valeur statistique (test de Student) : (\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.001$ , (\*\*)  $p\text{-value} < 0.01$ , (\*)  $p\text{-value} < 0.05$ .

La résonance à 0.9 ppm des macromolécules semble une nouvelle fois l'élément le plus stable du spectre. Pour identifier le plus justement possible les variations de concentrations mesurées dans le voxel de 56  $\mu\text{l}$

avec la STELASER, nous avons normalisé la concentration absolue des métabolites de chaque spectre individuel donnée par LCModel par la concentration absolue des macromolécules, moyennée sur les 10 spectres de chaque groupe. La concentration moyenne de la créatine totale du groupe WT est fixée à 8 mM pour représenter les variations de concentration avec des standards habituels (Figure 10-4-B).

Globalement, les mêmes variations de concentration que dans les voxels de 8  $\mu$ l sont retrouvées pour le groupe R6/1 par rapport au groupe WT :

- Augmentation de la concentration de tCr (+10 %)
- Augmentation de la concentration des tCho (+23 %)
- Augmentation de la concentration de Gln (+59 %)
- Légère augmentation de la concentration de la Tau (+5 %)
- Baisse de la concentration de NAA (-21 %)
- Baisse de la concentration de lactate (-27 %)
- Légère baisse de la concentration de Glu (-6 %)

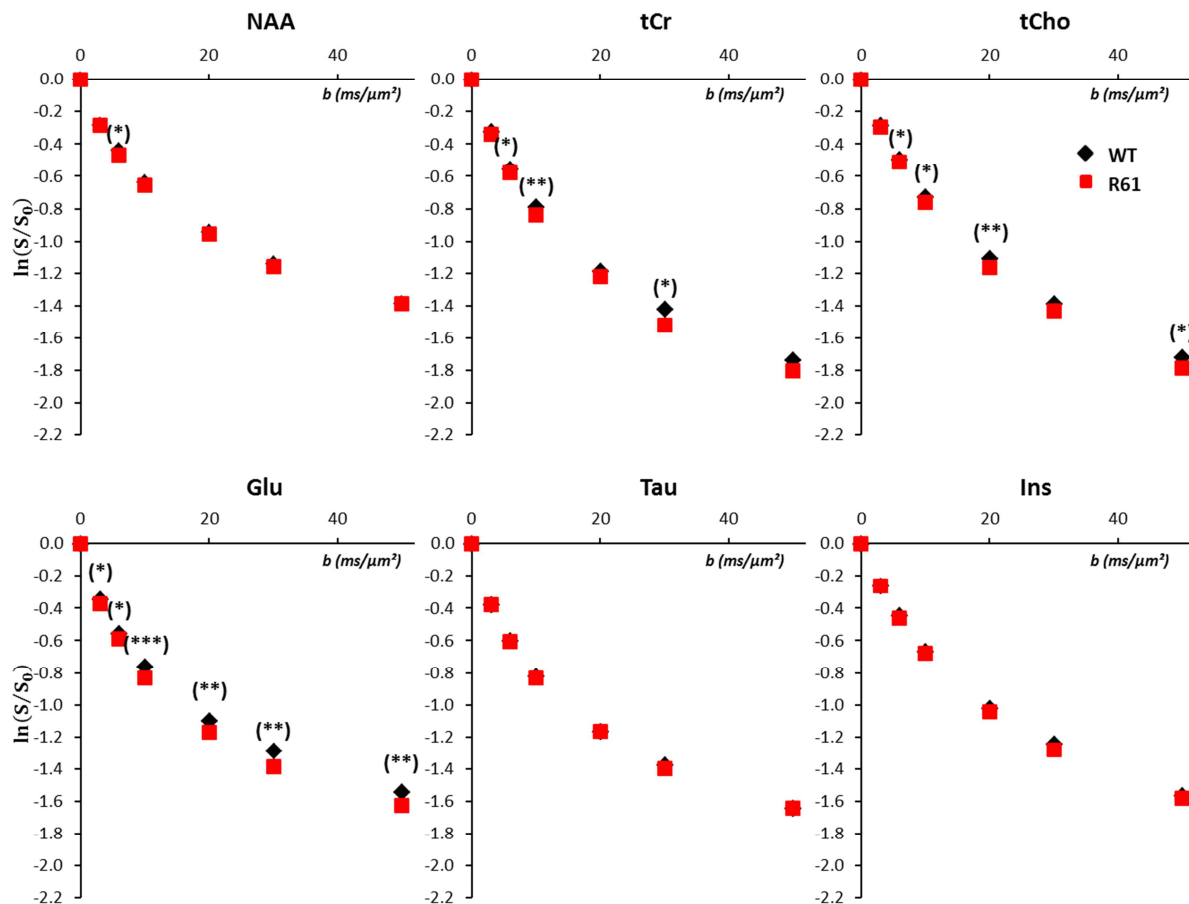
La concentration de myo-Inositol est parfaitement stable.

Les différences de concentration entre les groupes semblent moins marquées dans le voxel de 56  $\mu$ l que dans les voxels de 8  $\mu$ l. D'une part le shim est moins bon sur le voxel de 56  $\mu$ l, ce qui écrase un peu les pics, et d'autre part le temps d'écho n'est pas tout à fait le même (20 et 33 ms). Cela peut notamment expliquer la différence de variation R61/WT de la tCr entre les voxels de 8  $\mu$ l (+21 %) et le voxel de 56  $\mu$ l (+10 %). La concentration d'une partie de la population de tCr à  $T_2$  court pourrait augmenter davantage que la concentration du reste de tCr à  $T_2$  plus long. Cependant le voxel de 56  $\mu$ l contient aussi d'autres régions que le striatum et le thalamus : ces autres régions peuvent contribuer différemment au signal de créatine total et cette hétérogénéité pourrait expliquer la différence observée.

## **10.5 Spectroscopie de diffusion**

### **10.5.1 Mesures aux hautes valeurs de pondérations en diffusion**

L'atténuation du signal du groupe R6/1 est significativement plus importante pour les composés cholinergiques, la créatine et le glutamate : plusieurs points de la courbe d'atténuation reflètent une différence significative entre les deux groupes pour ces métabolites. Elle est stable pour le NAA, la taurine et le myo-inositol (Figure 10-5).



**Figure 10-5** : Atténuation du signal aux hautes valeurs de pondération en diffusion pour les 6 métabolites principaux (NAA, Glu, tCr, Tau, tCho, Ins). Les barres d'erreur représentent les erreurs types (non visibles car très petites). Valeur statistique (test de Student) : (\*\*\*)  $p$ -value < 0.001, (\*\*)  $p$ -value < 0.01, (\*)  $p$ -value < 0.05.

Une plus forte atténuation du signal du glutamate dans le groupe des R6/1 est inattendue, car cela pourrait correspondre à une augmentation du diamètre relatif des fibres dans lesquelles le glutamate, plutôt neuronal, diffuse. Dans le cadre de ce modèle animal de la MH, nous avons plutôt attribué cette variation à une augmentation de la concentration de glutamate dans les astrocytes par rapport aux neurones (voir Discussion).

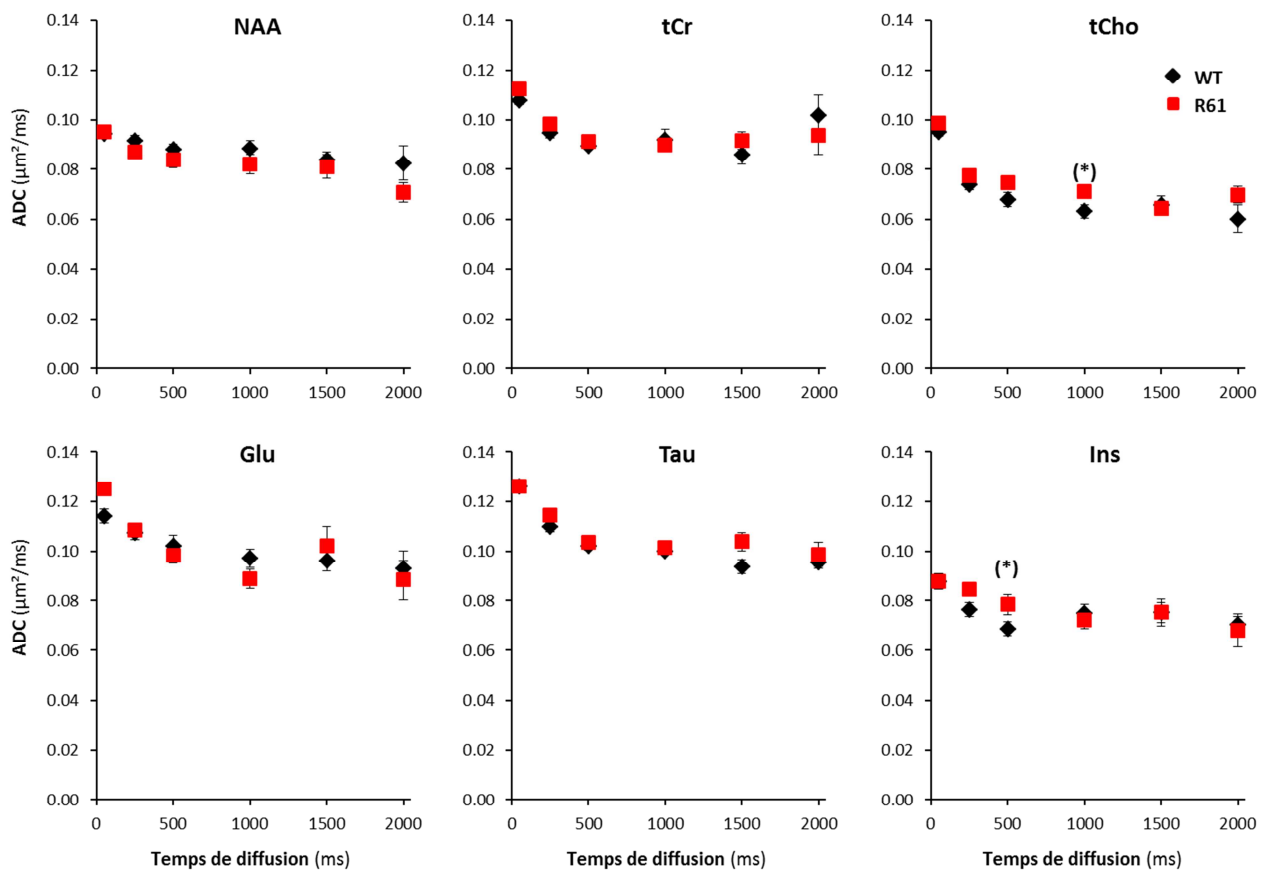
### 10.5.2 Mesures de l'ADC aux longs temps de diffusion

L'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion est très semblable entre les deux groupes pour tous les métabolites (Figure 10-6).

Cependant, certaines tendances se dégagent, notamment pour la choline et le NAA :

- Les ADC mesurés pour la choline sont plus élevés, particulièrement aux longs temps de diffusion, indiquant qu'elle diffuse probablement dans des compartiments de plus grande taille.
- L'ADC du NAA tend à diminuer avec l'augmentation du temps de diffusion pour le groupe R6/1. La tendance est très cohérente bien que les ADC pris individuellement à chaque  $t_d$  n'exhibent pas de différence significative entre les deux groupes.

Même si l'ADC du myo-inositol est significativement plus haut pour le groupe R6/1 à  $t_d=503.2$  ms, la tendance n'est pas claire à temps de diffusion plus longs.



**Figure 10-6** : ADC en fonction du temps de diffusion pour les 6 métabolites principaux (NAA, Glu, tCr, Tau, tCho, Ins). Les barres d'erreur représentent les erreurs types. Valeur statistique (test de Student) : (\*)  $p\text{-value} < 0.05$ .

## **10.6 Discussion**

La modélisation de ces données et les caractérisations immunohistochimiques et morphologiques (microscopie confocale) n'ont pas encore été réalisées au moment de la rédaction de ce manuscrit.

### **10.6.1 Concentrations**

Le modèle R6/1 a été très peu caractérisé en spectroscopie RMN. Seule une étude menée à 7 T sur des souris R6/1 âgées de 20 semaines rapporte une baisse de la concentration de NAA de 25 %, mais aucune variation de la concentration de choline ou de créatine totale (van Dellen et al., 2000). Cependant, l'étude est ancienne (champ plus bas, pas d'antenne cryogénique) et par conséquent les spectres présentés ne sont pas de qualité comparable avec ceux de ce manuscrit. Le modèle qui se rapproche le plus des R6/1, bien que présentant un phénotype beaucoup plus sévère, est le modèle R6/2. De façon générale, une hausse des concentrations des composés cholinergiques, de la taurine ainsi qu'une baisse de la concentration NAA sont rapportées à partir de 8 semaines d'âge (Jenkins et al., 2005 ; Tkac et al., 2007 ; Zacharoff et al., 2011). Les deux études les plus récentes, effectuées à 9.4 T rapportent également de fortes augmentations de la glutamine et de la créatine. En vieillissant, une augmentation de la concentration de myo-inositol est mesurée dans le striatum (presque stable dans le cortex).

Bien que les modèles diffèrent par certains points, ces similitudes en spectroscopie nous permettent d'envisager que le modèle R6/1 correspond à un stade précoce du développement de la pathologie du modèle R6/2, et que nous pouvons en partie nous référer à la littérature décrivant de jeunes R6/2 (typiquement, jusqu'à leur 8<sup>ème</sup> semaine de vie, lorsque le myo-inositol n'augmente pas encore dans le striatum) afin de discuter nos résultats.

Les autres modèles souris de la MH (avec insertion du gène complet de la huntingtine mutée humaine par exemple) ou les modèles de polyglutamines ont des profils de spectroscopie différents dans le striatum (Jenkins et al., 2005 ; Pépin et al., 2016), donc la comparaison du modèle R6/1 à d'autres modèles que les R6/2 est délicate.

### **10.6.2 Pas de signe d'activation astrocytaire mais un autre type d'activation gliale ?**

La concentration de myo-inositol ainsi que l'atténuation de son signal est très stable entre les deux groupes. L'étude présentée dans le chapitre 9 associe étroitement l'augmentation de sa concentration à l'hypertrophie des astrocytes, caractéristique de l'activation, au-delà d'une altération métabolique induit par l'activation astrocytaire. Plusieurs autres études mentionnées en §1.3 corrélaient positivement l'intensification de l'expression de la GFAP avec l'augmentation de la concentration de myo-inositol

(Filibian et al. 2012 ; Chen et al. 2012 ; Bitsch et al., 1999 ; Carrillo-de Sauvage et al., 2015). L'immunohistochimie (au moins l'expression de la GFAP) permettrait de conclure avec plus de certitude, mais la stabilité de la concentration et des propriétés diffusives du myo-inositol invite à conclure à une absence d'activation astrocytaire.

Les composés cholinergiques sont plutôt compartimentés dans les astrocytes (S1.3), ils sont cependant un marqueur moins net de l'activation astrocytaire (cf chapitre 9). Dans cette étude, où le myo-inositol est très stable, la forte augmentation de la concentration des tCho ainsi que ses propriétés de diffusion (ADC en fonction du td ou atténuation du signal en fonction de b) indiquent que les tCho diffusent dans de plus grands compartiments dans le groupe R6/1.

Une forte augmentation de la concentration tCho couplée à une diminution de la concentration du NAA pourrait être interprétée comme une perte neuronale avec dégradation des membranes (ce qui « libère » de la choline) : la proportion de choline extracellulaire pourrait être plus importante. Cependant, la différence d'atténuation n'est vraiment marquée qu'aux hautes valeurs de pondération en diffusion, ce qui est plus lié à un changement de rayon des fibres dans lesquelles les tCho diffusent. Il est possible que les tCho se trouvent proportionnellement en plus dans les astrocytes dans ce modèle de pathologie (par rapport aux autres cellules gliales plus petites par exemple). Il est également possible qu'un autre type de glie, comme la microglie, soit activée et que les tCho reflètent en partie le changement de morphologie associé. Lorsqu'elle est activée, la microglie peut également être hypertrophique ou dystrophique (Kondo et al., 2011 ; Streit et al., 2009).

Dans la MH humaine, une activation de la microglie est bien observée en association avec la neurodégénérescence (Sapp et al., 2001) et est même observée en amont des symptômes (Tai et al., 2007) et s'empire avec l'évolution de la maladie (Pavese et al., 2006). Chez les souris R6/2, de la microglie dystrophique a été mise en évidence (Simmons et al., 2007). Un marquage immunohistochimique d'Iba-1 permettrait d'avoir une idée de l'activation ou non de la microglie du groupe R6/1.

### **10.6.3 Le cas de la créatine totale**

L'atténuation du signal de la tCr aux hautes valeurs de pondération en diffusion est plus forte dans le groupe R6/1. Cela pourrait renforcer l'idée d'une activation gliale, comme le suggère l'étude de Ercan et al. (2016) menée sur des patients atteints de lupus érythémateux.

Dans l'étude de Tiret et al. (2016) en <sup>31</sup>P dans un modèle de rat BACHD, une augmentation de 10 % de la phosphocréatine est mesurée mais l'activité kinase reste stable donc le flux de production d'ATP par la PCr augmente, mais la quantité de PCr « libre » reste plus importante. Dans une autre étude, menée

notamment sur les R6/2 (Zhang et al., 2011), une nette augmentation du rapport PCr/ATP est rapportée chez les souris R6/2 par rapport aux contrôles, s'accompagnant cette fois d'une diminution de l'activité de la créatine kinase. La concentration de créatine est également plus importante. L'interaction avec l'enzyme est rapide et est moins restrictive qu'un compartiment de petite taille par exemple (mitochondrie, vésicules etc), cependant elle pourrait ralentir la diffusion de la tCr en interaction avec elle. Comme la proportion de tCr en interaction avec la créatine kinase est donc très probablement plus faible & dans le groupe R6/2, la tCr « libre » y est plus importante aussi. Comme nous notons aussi une forte augmentation de la concentration de tCr dans le groupe R6/1 (Figure 10-3), il est possible que la proportion de tCr « libre » du groupe R6/1 augmente, ce qui expliquerait en partie l'atténuation du signal plus forte pour le groupe R6/1.

#### **10.6.4 Le cas du NAA**

La concentration de NAA est très basse dans le groupe R6/1. Comme l'atténuation de son signal n'est pas plus faible aux hautes valeurs de pondérations diffusion, cela signifie qu'il ne diffuse a priori pas dans des structures de diamètre plus fin, comme on pourrait s'y attendre en cas d'atrophie neuronale. Cependant, son ADC semble diminuer avec l'augmentation du temps de diffusion. L'extension neuronale est plus donc potentiellement plus faible dans le groupe R6/1, ce qui est envisageable d'après des études mettant en évidence des dendrites dystrophiques dans un modèle souris de la MH (Laforet et al., 2001) ou montrant des neurites plus courts pour certains types de neurones de l'hippocampe des R6/1 dès 10 semaines (Lazic et al., 2006). De plus l'étude de Jenkins et al. (2005) rapporte une corrélation claire entre la diminution de la concentration de NAA au cours du temps avec l'aire occupée par les neurones. La modélisation (Palombo et al., 2016 ; §8.4) de ces données à temps de diffusion long pour le NAA nous donnera une indication quantitative sur une potentielle différence des paramètres d'extension spatiale des neurones entre le groupe R6/1 et le groupe WT.

#### **10.6.5 Glutamate/Glutamine**

Le glutamate (Figure 10-5) présente une atténuation de signal significativement plus forte dans le groupe des R6/1. De plus la concentration de glutamine augmente très fortement et très significativement.

Plusieurs études rapportent une diminution de l'expression du transporteur au glutamate dans les astrocytes GLT-1 chez les patient atteints de la MH, chez les souris R6/2 (Behrens et al., 2002) et R6/1 (Lievens et al., 2001). Le GLT-1 permet aux astrocytes de recapturer le glutamate libéré dans la fente synaptique. La revue d'Estrada-Sanchez et Rebec (2012) propose une synthèse de l'implication de GLT-1 dans la MH.

Comme l'atténuation du signal du glutamate est plus forte dès  $b=3 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et comme les fibres neuronales n'ont a priori pas un diamètre plus important (d'après le modèle de la pathologie et les données du NAA), nous avons d'abord pensé à la possibilité d'une contribution extracellulaire de glutamate plus importante chez les R6/1, en accord avec la diminution de l'expression de GLT-1.

Cependant, les études qui étudient par microdialyse les concentrations extracellulaires de glutamate et de glutamine dans les modèles de MH tendent plutôt à montrer une baisse (sur les R6/1, NicNiocail et al., 2001) ou une stabilité (sur les R6/2, Behrens et al., 2002) de la concentration extracellulaire basale de glutamate dans le striatum. Face à un stress excitotoxique exogène important, la recapture de glutamate mesurée par microdialyse est effectivement moins performante dans ces études, mais nos mesures sur souris anesthésiées sont plutôt à rapprocher des mesures effectuées à l'état basal. De plus les variations de concentration extracellulaires obtenues par microdialyse sont de toute façon trop faibles ( $\sim\mu\text{M}$ ) pour être détectées en spectroscopie RMN.

Dans ces mêmes études, les autres transporteurs au glutamate des astrocytes (GLAST, EAAC1) ne sont pas altérés, voire marquent une tendance à la hausse (Behrens et al., 2002). A l'état basal, il est probable que les astrocytes des R6/1 recapturent correctement le glutamate extracellulaire.

En outre, l'expression de la glutamine synthétase (GS), enzyme qui transforme le glutamate en glutamine dans les astrocytes est altérée dans les R6/1 et R6/2 : il est possible que le glutamate ne soit pas bien converti en glutamine dans les astrocytes, et que la concentration du glutamate augmente dans ces derniers. Cela expliquerait le comportement diffusif du glutamate aux hautes valeurs de  $b$ , qui semble se trouver dans des fibres plus larges.

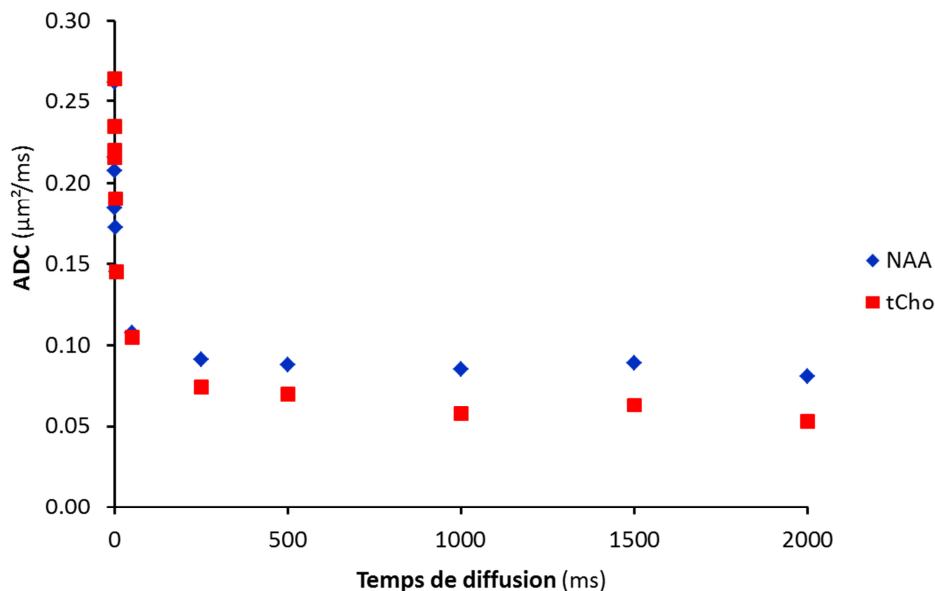
Cette explication est au premier abord contre intuitive avec l'augmentation très importante de glutamine observée chez les R6/1. Néanmoins, une dérégulation du cycle de l'urée (foie), associée à une hyperammoniémie (excès d'ammoniaque dans le sang) a été mesurée chez des souris R6/2 (Chiang et al., 2007). L'hyperammoniémie cause une forte augmentation de la concentration de glutamine dans le SNC et dans le même temps une diminution de l'activité de la glutamine synthétase (Suarez et al., 2002 ; Lanz et al., 2017), et est liée à une dérégulation du cycle glutamate/glutamine. De plus comme l'absorption de glucose décroît avec l'âge (évaluée par FDG) chez les R6/2 (Wang et al. 2005), le métabolisme oxydatif pourrait se reposer davantage sur l'oxydation de la glutamine par exemple.



## DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

---

L'exploration de la diffusion des métabolites sur des distances caractéristiques comprises entre 0.4 et 20  $\mu\text{m}$  au sein de la même espèce (souris) constitue d'abord une synthèse des travaux effectués à temps de diffusion courts par Charlotte Marchadour, sur le rat, et à temps de diffusion longs par Chloé Najac, sur le macaque (Figure Discussion). La cohérence de cet ensemble de mesures permet au premier coup d'œil de confirmer à nouveau que la diffusion des métabolites a bien lieu préférentiellement dans les fibres plutôt que dans les corps cellulaires ou à l'intérieur d'organelles. Associées à la modélisation (Palombo et al., 2016), les mesures de l'ADC des métabolites aux temps de diffusion très longs permettent également de renforcer l'hypothèse de la compartimentation préférentielle du N-acétylaspartate et du glutamate dans les neurones et du myo-inositol et de la choline totale dans les astrocytes (chapitre 8).



**Figure Discussion** : ADC du NAA (diamants bleus) et des tCho (carrés rouges) en fonction du temps de diffusion. Les ADC compris entre 1 et 5 ms (50-250 Hz) viennent des données présentées dans le chapitre 7. Les ADC compris entre  $t_d=50$  ms et  $t_d=2000$  ms viennent des données acquises sur les souris contrôle (LacZ) du chapitre 9.

La stratégie développée (cosinus apodisé étiré) à temps de diffusion très courts a notamment permis de raccourcir le temps d'écho à  $TE=60$  ms et de mesurer la diffusion de nouveaux métabolites présentant un couplage scalaire comme le myo-inositol (chapitre 7). La possibilité de quantifier les macromolécules résonnant autour de 0.9 ppm nous a permis de détecter les acquisitions biaisées par un artefact de mouvement à certaines fréquences. De façon générale, le travail réalisé pendant cette thèse souligne

l'importance de quantifier le plus justement possible les macromolécules lors des mesures de spectroscopie de diffusion (chapitre 5). Pour la première fois, une mesure des ADC du NAA, des tCho et de la tCr à 667 Hz ( $t_d \approx 0.2$  ms) a été réalisée *in vivo* (rat) grâce à un gradient plus intense. Bien que la modélisation de ces données semble permettre d'estimer de manière plutôt juste les rapports surface sur volume des fibres dans lesquelles les métabolites diffusent (chapitre 8), les mesures individuelles effectuées avec les gradients oscillants restent trop bruitées pour les appliquer en contexte pathologique.

La séquence STELASER (chapitre 6) est conçue pour que le calcul de la pondération en diffusion ne contienne pas de termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie. En premier lieu, elle nous a permis de vérifier que l'atténuation du signal mesurée pour étudier la diffusion des métabolites est indépendante de la relaxation transversale de ces derniers. Il est donc légitime de négliger la relaxation et de considérer des modèles géométriques purs, au moins dans l'intervalle de temps d'échos étudié (33-73 ms) dans cette thèse. Seul le NAA présente une légère différence en fonction du TE à hautes valeurs de  $b$ , qui pourrait être liée à une petite fraction fixe de NAA de  $T_2$  plus court, éventuellement mitochondrial (chapitre 8).

La STELASER est bien adaptée à la mesure de l'atténuation du signal à de très hautes pondérations en diffusion ( $b_{\max} = 60$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ), sur des distances de diffusion sensibles à la restriction imposée par le rayon des fibres, ainsi que de l'ADC des métabolites à des temps de diffusion très longs ( $t_d = 2000$  ms, distance de diffusion caractéristique  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ ). Les mesures étant assez peu bruitées et reproductibles, nous avons appliqué ces deux types de mesures à un modèle d'activation astrocytaire induit par transfert du gène CNTF chez la souris (chapitre 9). Les comportements diffusifs du myo-inositol et des composés cholinergiques reflètent bien l'hypertrophie des astrocytes (augmentation du rayon et de la longueur des processus astrocytaires), que nous avons caractérisée en parallèle *ex vivo* par microscopie co-focale à balayage laser. Enfin, nous avons réalisé la même série d'expériences sur un modèle souris de la maladie de Huntington (R6/1) (chapitre 10). Les résultats en spectroscopie de diffusion semblent suggérer une altération de la morphologie neuronale et une activation gliale (mais pas nécessairement astrocytaire) ou un changement de compartimentation des métabolites. La modélisation et la caractérisation *ex vivo* apporteront des éléments de réponse supplémentaires.

La variation drastique de l'atténuation du signal du lactate aux hautes valeurs de  $b$ , mesurée dans l'étude CNTF du chapitre 9 et notamment possible grâce à l'évaluation de la contribution des macromolécules, suggère une augmentation de la concentration relative de lactate dans les neurones, manifestement couplée à remodelage du métabolisme neuronal et astrocytaire. Cette mesure est prometteuse pour l'étude des maladies neurologiques.

Bien que le comportement diffusif de la plupart des métabolites puisse s'interpréter selon la géométrie des compartiments dans lesquels ils diffusent, le comportement de la créatine totale nous apparaît ambigu aux temps de diffusion longs, car l'ADC semble assez généralement remonter ( $ADC_{TM=2000\text{ ms}} > ADC_{TM=500\text{ ms}}$ , chapitres 6, 9, 10). Pour rappel, la créatine totale est la somme de la contribution de la phosphocréatine (PCr) et de la créatine (Cr), dont les résonances sont si proches sur le spectre proton qu'il est en général impossible de les dissocier. La PCr et la Cr sont liées par l'action de la créatine kinase (CK), qui catalyse la réaction  $PCr + ADP \rightarrow Cr + ATP$ . Nous avons pensé que l'action de la CK pouvait avoir un effet sur la diffusion de la créatine totale. Cependant, une expérience menée sur fantôme, présentée par Itamar Ronen au 25<sup>ème</sup> congrès annuel de l'ISMRM (dans le cadre de l'étude en FEXSY de Wolf et al., 2017) ne rapporte aucune différence de la diffusion de la tCr entre un fantôme contenant initialement de la PCr et de la Cr et un fantôme contenant de la PCr, de l'ADP et de la CK. De toute façon, le phénomène qui lierait l'action d'une enzyme en interaction avec un métabolite à une augmentation de son ADC avec le temps de diffusion n'est absolument pas évident. Néanmoins, pendant cette expérience sur fantôme, les constantes de relaxation longitudinales ainsi que les coefficients de diffusion libre de la créatine et de la phosphocréatine ont été mesurés séparément. Nous savions que la créatine diffuse plus rapidement que la phosphocréatine (au moins d'un facteur 1.3), mais la plupart des études de la littérature *in vivo* mesurent la relaxation longitudinale de créatine totale. Or, d'après les données sur fantôme,  $T_1(Cr) \approx 2 * T_1(PCr)$ . Nous allons effectuer des simulations pour évaluer dans quelle mesure la restriction et la relaxation longitudinale entrent en compétition dans ces échelles de temps de diffusion longs.

Enfin, si un métabolite, associé à un type cellulaire et donc censé être le marqueur d'une éventuelle variation de morphologie de ce type cellulaire, change de type cellulaire en conditions pathologiques, cela peut compliquer l'interprétation des données de diffusion. C'est probablement le cas pour le glutamate, marqueur plutôt neuronal, qui semble se trouver davantage dans les astrocytes du groupe R6/1 à cause d'une potentielle dérégulation du cycle métabolique glutamate/glutamine.

En conclusion, ce travail de thèse souligne le potentiel de la spectroscopie de diffusion pour explorer le milieu intracellulaire du cerveau, d'une part comme un indicateur de la structure cellulaire des neurones et des astrocytes et d'autre part (et dans une moindre mesure) comme un indicateur de troubles métaboliques. L'interprétation et la modélisation des données en termes de structure semblent faisables et prometteuses, même si d'autres phénomènes pourraient jouer un rôle à la marge.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adler, R., Landa, K. B., Manthorpe, M., & Varon, S. (1979). Cholinergic Neurotrophic Factors : Intraocular Distribution of Trophic Activity for Ciliary Neurons. *Science*, 204(June), 1434–1437.
- Aebischer, P., Schluep, M., Déglon, N., Joseph, J.-M., Hirt, L., Heyd, B., ... Baetge, E. E. (1996). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nature Medicine*, 2.
- Anderson, K. D., Panayotatos, N., Corcoran, T. L., Lindsay, R. M., & Wiegand, S. J. (1996). Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(July), 7346–7351.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431, 805–810.
- Assaf, Y., & Cohen, Y. (1998). In vivo and in vitro bi-exponential diffusion of N-acetyl aspartate (NAA) in rat brain: a potential structural probe? *NMR in Biomedicine*, 11(2), 67–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608590>
- Assaf, Y., & Cohen, Y. (1998). Non-Mono-Exponential Attenuation of Water and N -Acetyl Aspartate Signals Due to Diffusion in Brain Tissue. *Journal of Magnetic Resonance*, 131, 69–85.
- Assaf, Y., & Cohen, Y. (1999). Structural information in neuronal tissue as revealed by q-space diffusion NMR spectroscopy of metabolites in bovine optic nerve. *NMR in Biomedicine*, 12(6), 335–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516615>
- Assaf, Y., & Cohen, Y. (2000). Assignment of the Water Slow-Diffusing Component in the Central Nervous System Using q-Space Diffusion MRS : Implications for Fiber Tract Imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 43, 191–199.
- Barkhuijsen, H., De Beer, R., Bovee, W. M. M. J., & Creyghton, J. H. N. (1985). Application of Linear Prediction and Singular Value Decomposition (LPSVD) to Determine NMR Frequencies and Intensities from the FID. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2, 86–89.
- Baron, C. a., & Beaulieu, C. (2014). Oscillating gradient spin-echo (OGSE) diffusion tensor imaging of the human brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 72(3), 726–36. doi:10.1002/mrm.24987
- Basser, P. J., Mattiello, J., & Lebihan, D. (1994). Estimation of the effective Self-Diffusion Tensor from the NMR Spin Echo. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 1, 247–254.
- Bayram-Weston, Z., Jones, L., Dunnett, S. B., & Brooks, S. P. (2012). Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in the R6 / 1 Huntington's disease transgenic mice. *Brain Research Bulletin*, 88(2-3), 104–112. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.07.009
- Beaulieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR in Biomedicine*, 15, 435–455. doi:10.1002/nbm.782
- Behar, K. L., & Ogino, T. (1991). Characterization of Macromolecule Resonances in the <sup>1</sup>H NMR Spectrum of Rat Brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 30, 38–44.

- Behrens, P. F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K. S., Landwehrmeyer, G. B., & Freiburg, È. (2002). Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling : downstream effects of the Huntington mutation. *Brain*, 125, 1908–1922.
- Belle, J. E. Le, Harris, N. G., Williams, S. R., & Bhakoo, K. K. (2002). A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 15, 37–44. doi:10.1002/nbm.740
- Ben Haim, L., Sauvage, M. C., Ceyzériat, K., & Curtin, J. F. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(August), 1–27. doi:10.3389/fncel.2015.00278
- Bitsch, A., Bruhn, H., Vougioukas, V., Stringaris, A., Lassmann, H., Frahm, J., & Bru, W. (1999). Inflammatory CNS Demyelination : Histopathologic Correlation with In Vivo Quantitative Proton MR Spectroscopy. *American Journal of Neuroradiology*, 20, 1619–1627.
- Bloch, F. (1946). Nuclear Induction. *Physical Review*, 70(7&8), 460–474.
- Bloch, J., Bachoud-Lévi, A. C., Liebert, M. A., Déglon, N., Lefaucheur, J. P., Winkel, L., ... Peschanski, M. (2004). Neuroprotective Gene Therapy for Huntington ' s Disease , Using Polymer-Encapsulated Cells Engineered to Secrete Human Ciliary Neurotrophic Factor : Results of a Human Gene Therapy, 975(October), 968–975.
- Boer, V. O., Van Lier, A. L. H. M. W., Hoogduin, J. M., Wijnen, J. P., & Luijten, P. R. (2011). 7T <sup>1</sup>H MRS with adiabatic refocusing at short TE using radiofrequency focusing with a dual-channel volume transmit coil. *NMR in Biomedicine*, 24, 1038–1046. doi:10.1002/nbm.1641
- Boretius, S., Tammer, R., Michaelis, T., Brockmöller, J., & Frahm, J. (2013). NeuroImage Halogenated volatile anesthetics alter brain metabolism as revealed by proton magnetic resonance spectroscopy of mice in vivo. *NeuroImage*, 69, 244–255. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.12.020
- Branzoli, F., Ercan, E., Webb, A., & Ronen, I. (2014). The interaction between apparent diffusion coefficients and transverse relaxation rates of human brain metabolites and water studied by diffusion-weighted spectroscopy at 7 T. *NMR in Biomedicine*, 27, 495–506. doi:10.1002/nbm.3085
- Branzoli, F., Techawiboonwong, A., Kan, H., Webb, A., & Ronen, I. (2013). Functional diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of the human primary visual cortex at 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 69(2), 303–9. doi:10.1002/mrm.24542
- Callaghan, P. T., Coy, A., MacGowan, D., Packer, K. J., & Zelaya, F. O. (1991). Diffraction-Like Effects in NMR Diffusion Studies of Fluids in Porous Solids. *Nature*, 351, 467.
- Callaghan, P. T., Eccles, C. D., & Xia, Y. (1988). NMR microscopy of dynamic displacements: k-space and q-space imaging. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 21, 820–822.
- Callaghan, P. T., & Stepišnik, J. (1995). Frequency-Domain Analysis of Spin Motion Using. *J Magn Reson Ser*, 117, 118–122.

- Carr, H. Y., & Purcell, E. M. (1954). Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*, 94, 630–638.
- Carrillo-de Sauvage, M.-A., Flament, J., Bramouille, Y., Haim, L. Ben, & Guillermier, M. (2015). The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum : an in vivo multimodal magnetic resonance imaging study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(April), 917–921. doi:10.1038/jcbfm.2015.48
- Cattaneo, E., Zuccato, C., & Tartari, M. (2005). Normal Huntingtin Function: an Alternative Approach to Huntington's Disease. *Nature*, 6, 919–930. doi:10.1038/nrn1806
- Cavus, I., Kasoff, W. S., Cassaday, M. P., Jacob, R., Gueorguieva, R., Sherwin, R. S., ... Abi-saab, W. M. (2005). Extracellular Metabolites in the Cortex and Hippocampus of Epileptic Patients. *Annals of Neurology*, 57, 226–235. doi:10.1002/ana.20380
- Chen, S., Cai, Q., Shen, Y., Wang, P., & Teng, G. (2012). Age-related changes in brain metabolites and cognitive function in APP / PS1 transgenic mice. *Behavioural Brain Research*, 235(1), 1–6. doi:10.1016/j.bbr.2012.07.016
- Chiang, M., Chen, H., Lee, Y., Chang, H., Wu, Y., Soong, B., ... Chern, Y. (2007). Dysregulation of C/EBP a by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 16(5), 483–498. doi:10.1093/hmg/ddl481
- Chklovskii, D. B., Schikorski, T., & Stevens, C. F. (2002). Wiring Optimization in Cortical Circuits. *Neuron*, 34, 341–347.
- Choi, J., Dedeoglu, A., & Jenkins, B. G. (2007). Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR in Biomedicine*, 20, 216–237. doi:10.1002/nbm
- Cory, D. G., & Garroway, A. N. (1990). Measurement of Translational Displacement Probabilities by NMR : An Indicator of Compartmentation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 14, 435–444.
- Cruz, T., Balayssac, S., Gilard, V., Martino, R., Vincent, C., & Malet-Martino, M. (2014). H NMR Analysis of Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease Patients: An Example of a Possible Misinterpretation Due to Non-Adjustment of pH. *Metabolites*, 4, 115–128. doi:10.3390/metabo4010115
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., Difiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., ... Bates, G. P. (1997). Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. *Cell*, 90, 537–548.
- De Graaf, R. A., Brown, P. B., McIntyre, S., Nixon, T. W., Behar, K. L., & Rothman, D. L. (2006). High Magnetic Field Water and Metabolite Proton T1 and T2 Relaxation in Rat Brain In Vivo. *Magnetic Resonance in Medicine*, 394(April), 386–394. doi:10.1002/mrm.20946
- Difiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., & Aronin, N. (1997). Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain. *Science*, 277(September), 1990–1993.

- Does, M. D., Parsons, E. C., & Gore, J. C. (2003). Oscillating gradient measurements of water diffusion in normal and globally ischemic rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 49(2), 206–15. doi:10.1002/mrm.10385
- Duarte, J. M. N., Lei, H., Mlynárik, V., & Gruetter, R. (2012). The neurochemical profile quantified by in vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *NeuroImage*, 61, 342–362. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.12.038
- Duong, T. Q., Sehy, J. V., Yablonskiy, D. a, Snider, B. J., Ackerman, J. J., & Neil, J. J. (2001). Extracellular apparent diffusion in rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 45(5), 801–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323806>
- El Idrissi, A., & Trenkner, E. (2004). Taurine as a Modulator of Excitatory and Inhibitory Neurotransmission. *Neurochemical Research*, 29(1), 189–197.
- Ercan, E., Magro-checa, C., Valabregue, R., Branzoli, F., Wood, E. T., Steup-beekman, G. M., ... Ronen, I. (2016). Glial and axonal changes in systemic lupus erythematosus measured with diffusion of intracellular metabolites. *Brain*, 139, 1447–1457. doi:10.1093/brain/aww031
- Ernst, R. R., & Anderson, W. A. (1966). Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *The Review of Scientific Instruments*, 37, 93–102. doi:10.1063/1.1719961
- Escartin, C., & Bonvento, G. (2008). Targeted Activation of Astrocytes : A Potential Neuroprotective Strategy. *Molecular Neurobiology*, 38, 231–241. doi:10.1007/s12035-008-8043-y
- Escartin, C., Brouillet, E., Gubellini, P., Jacquard, C., Smadja, C., Knott, G. W., ... Bonvento, G. (2006). Ciliary Neurotrophic Factor Activates Astrocytes , Redistributes Their Glutamate Transporters GLAST and GLT-1 to Raft Microdomains , and Improves Glutamate Handling In Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 26(22), 5978–5989. doi:10.1523/JNEUROSCI.0302-06.2006
- Escartin, C., Pierre, K., Brouillet, E., Delzescaux, T., Guillermier, M., Dhenain, M., ... Bonvento, G. (2007). Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults. *The Journal of Neuroscience*, 27(27), 7094–7104. doi:10.1523/JNEUROSCI.0174-07.2007
- Faideau, M., Kim, J., Cormier, K., Gilmore, R., Welch, M., Auregan, G., ... Bonvento, G. (2010). In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport : a correlation with Huntington’s disease subjects. *Human Molecular Genetics*, 19(15), 3053–3067. doi:10.1093/hmg/ddq212
- Ferrante, R. J., Andreassen, O. A., Jenkins, B. G., Dedeoglu, A., Kuemmerle, S., Kubilus, J. K., ... Beal, M. F. (2000). Neuroprotective Effects of Creatine in a Transgenic Mouse Model of Huntington ’ s Disease. *The Journal of Neuroscience*, 20(12), 4389–4397.
- Fieremans, E., Burcaw, L. M., Lee, H., Lemberskiy, G., Veraart, J., & Novikov, D. S. (2016). In vivo observation and biophysical interpretation of time-dependent diffusion in human white matter. *NeuroImage*. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.01.018



- Filibian, M., Frasca, A., Maggioni, D., Micotti, E., Vezzani, A., & Ravizza, T. (2012). In vivo imaging of glia activation using <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy to detect putative biomarkers of tissue epileptogenicity. *Epilepsia*, 53(11), 1907–1916. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03685.x
- Fisher, S. K., Novak, J. E., & Agranoff, B. W. (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues : homeostasis , metabolism and functional significance. *Journal of Neurochemistry*, 82, 736–754.
- Frahm, J., Bruhn, H., Gyngell, M. L., Merboldt, K. D., Hänicke, W., & Sauter, R. (1989). Localized High-Resolution Proton NMR Spectroscopy Using Stimulated Echoes: Initial Applications to Human Brain In Vivo. *Magnetic Resonance in Medicine*, 9, 79–93.
- Garwood, M., & DelaBarre, L. (2001). The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 153(2), 155–77. doi:10.1006/jmre.2001.2340
- Gerlach, W., & Stern, O. (1922). Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld. *Zeitschrift Für Physik*, 349–352.
- Govindaraju, V., Young, K., & Maudsley, a a. (2000). Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*, 13(3), 129–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861994>
- Grace, E. A., Rabiner, C. A., & Busciglio, J. A. (2002). CHARACTERIZATION OF NEURONAL DYSTROPHY INDUCED BY FIBRILLAR AMYLOID L : IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE. *Neuroscience*, 114(1), 265–273.
- Grif, J. L., Bollard, M., Nicholson, J. K., & Bhakoo, K. (2002). Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 15, 375–384. doi:10.1002/nbm.792
- Gross, B., & Kosfeld, R. (1969). Anwendung der spin-echo-methode der messung der selbstdiffusion. *Messtechnik*, 77, 171–177.
- Haas, S. J., Ahrens, A., Petrov, S., Schmitt, O., & Wree, A. (2004). Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *Journal of Anatomy*, 204, 271–281.
- Haase, A., Frahm, J., Hänicke, W., & Matthaei, D. (1985). <sup>1</sup>H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in Medicine & Biology*, 30(4), 341–344.
- Hahn, E. L. (1950). Spin Echoes. *Physical Review*, 80, 580–594.
- Hamby, M. E., & Sofroniew, M. V. (2010). Reactive Astrocytes As Therapeutic Targets for CNS Disorders. *Neurotherapeutics*, 7(October), 494–506.
- Harrison, D. J., Busse, M., Openshaw, R., Rosser, A. E., Dunnett, S. B., & Brooks, S. P. (2013). Exercise attenuates neuropathology and has greater benefit on cognitive than motor deficits in the R6/1 Huntington's disease mouse model. *Experimental Neurology*, 248, 457–469.

- Hillered, L., Hallstrom, A., Segersvard, S., Persson, L., & Vngerstedt, V. (1989). Dynamics of Extracellular Metabolites in the Striatum After Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat Monitored by Intracerebral Microdialysis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 9, 607–616.
- Hudgins, S. N., & Levison, S. W. (1998). Ciliary Neurotrophic Factor Stimulates Astroglial Hypertrophy in Vivo and in Vitro. *Experimental Neurology*, 182(150), 171–182.
- Isaacks, R. E., Bender, A. S., Kim, C. Y., Shi, Y. F., & Norenberg, M. D. (1999). Effect of Osmolality and Anion Channel Inhibitors on myo -Inositol Efflux in Cultured Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 871(May), 866–871.
- Jenkins, B. G., Andreassen, O. A., Dedeoglu, A., Leavitt, B., Hayden, M., Borchelt, D., ... Beal, M. F. (2005). Effects of CAG repeat length , HTT protein length and protein context on cerebral metabolism measured using magnetic resonance spectroscopy in transgenic mouse models of Huntington’s disease. *Journal of Neurochemistry*, 95, 553–562. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03411.x
- Jenkins, B. G., Klivenyi, P., Kustermann, E., Andreassen, O. A., Ferrante, R. J., Rosen, B. R., & 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, 2108–2119.
- Jespersen, S. N., Kroenke, C. D., Østergaard, L., Ackerman, J. J. H., & Yablonskiy, D. A. (2007). Modeling dendrite density from magnetic resonance diffusion measurements. *NeuroImage*, 34, 1473–1486. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.10.037
- Kan, H. E., Techawiboonwong, A., Osch, M. J. P. Van, Versluis, M. J., Deelchand, D. K., Henry, P., ... Ronen, I. (2012). Differences in Apparent Diffusion Coefficients of Brain Metabolites Between Grey and White Matter in the Human Brain Measured at 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 67, 1203–1209. doi:10.1002/mrm.23129
- Knight-scott, J. (1999). Application of Multiple Inversion Recovery for Suppression of Macromolecule Resonances in Short Echo Time 1H NMR Spectroscopy of Human Brain. *Journal of Magnetic Resonance*, 140, 228–234.
- Kondo, S., Kohsaka, S., & Okabe, S. (2011). Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Molecular Brain*, 4(27), 1–16.
- Kroenke, C. D., Ackerman, J. J. H., & Yablonskiy, D. A. (2004). On the Nature of the NAA Diffusion Attenuated MR Signal in the Central Nervous System. *Magnetic Resonance in Medicine*, 52, 1052–1059. doi:10.1002/mrm.20260
- Kuchel, P. W., Coy, A., & Stilbs, P. (1996). NMR “Diffusion-Diffraction” of Water Revealing Alignment of Erythrocytes in a Magnetic Field and Their Dimensions and Membrane Transport Characteristics. *Magnetic Resonance in Medicine*, 37, 637–643.
- Laforet, G. A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F. M., Campbell, M., ... Aronin, N. (2001). Changes in Cortical and Striatal Neurons Predict Behavioral and Electrophysiological Abnormalities in a Transgenic Murine Model of Huntington’s Disease. *The Journal of Neuroscience*, 21(23), 9112–9123.

- Lambert, P. D., Anderson, K. D., Sleeman, M. W., Wong, V., Tan, J., Hjarunguru, A., ... Wiegand, S. J. (2001). Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 4652–4657.
- Lanz, B., Rackayova, V., Braissant, O., & Cudalbu, C. (2017). MRS studies of neuroenergetics and glutamate/glutamine exchange in rats: Extensions to hyperammonemic models. *Analytical Biochemistry*, 529, 245–269.
- Lazic, S. E., Grote, H. E., Blakemore, C., Hannan, A. J., Van Dellen, A., Phillips, W., & Barker, R. A. (2006). Neurogenesis in the R61 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 23, 1829–1838. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04715.x
- Lee, M., Kim, C., Shin, S., Moon, S.-H., & Chun, M.-H. (1998). Increased ciliary neurotrophic factor expression in reactive astrocytes following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience Letters*, 255, 79–82.
- Lemberskiy, G., Baete, S. H., Cloos, M., Novikov, D. S., & Fieremans, E. (2017). Validation of surface-to-volume ratio measurements derived from oscillating gradient spin echo on a clinical scanner using anisotropic fiber phantoms. *NMR in Biomedicine*, 30. doi:10.1002/nbm.3708
- Levine, M. S., Cepeda, C., Hickey, M. A., & Fleming, S. M. (2004). Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect. *Trends in Neurosciences*, 27(11), 692–697. doi:10.1016/j.tins.2004.08.008
- Liévens, J.-C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Bosovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L., & Bates, G. P. (2001). Impaired Glutamate Uptake in the R6 Huntington's Disease Transgenic Mice. *Neurobiology of Disease*, 8, 807–821. doi:10.1006/nbdi.2001.0430
- Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2017). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(4), 1390–1398. doi:10.1002/mrm.26217
- Long, J. M., Kalehua, A. N., Muth, N. J., Calhoun, M. E., Jucker, M., Hengemihle, J. M., ... Mouton, P. R. (1998). Stereological Analysis of Astrocyte and Microglia in Aging Mouse Hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 19(5), 497–503.
- Lopez-kolkovsky, A. L., Mériaux, S., & Boumezeur, F. (2016). Metabolite and Macromolecule T1 and T2 Relaxation Times in the Rat Brain in vivo at 17.2T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 75, 503–514. doi:10.1002/mrm.25602
- Lowe, I. J., & Norberg, R. E. (1957). Free-Induction Decays in Solids. *Physical Review*, 107(1), 46–61.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., ... Bates, G. P. (1996). Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. *Cell*, 87, 493–506.

- Manthorpe, M., Skaper, S., Adler, R., Landa, K., & Varon, S. (1980). Cholinergic Neuronotrophic Factors : Fractionation Properties of an Extract from Selected Chick Embryonic Eye Tissues. *Journal of Neurochemistry*, 34(1), 69–75.
- Marchadour, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Lebon, V., & Valette, J. (2012). Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(12), 2153–60. doi:10.1038/jcbfm.2012.119
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K. P., & Norenberg, M. D. (1977). Glutamine Synthetase : Glial Localization in Brain. *Science*, 195(10).
- Matthews, P. M., Andermann, F., Silver, K., Karpati, G., & Arnold, D. L. (1993). Proton MR spectroscopic characterization of differences in regional brain metabolic abnormalities in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology*, 43.
- Menon, R. S., & Allen, P. S. (1991). Application of Continuous Relaxation Time Distributions to the Fitting of Data from Model Systems and Excised Tissue. *Magnetic Resonance in Medicine*, 20, 214–227.
- Mitra, P. P., Sen, P. N., Schwartz, L. M., & Le Doussal, P. (1992). Diffusion Propagator as a Probe of the Structure of Porous Media. *Physical Review Letters*, 68(24), 3555–3558.
- Najac, C., Branzoli, F., Ronen, I., & Valette, J. (2016). Brain intracellular metabolites are freely diffusing along cell fibers in grey and white matter, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. *Brain Structure & Function*, 221(3)(6), 1245–1254. doi:10.1007/s00429-014-0968-5
- Najac, C., Marchadour, C., Guillermier, M., Houitte, D., Slavov, V., Brouillet, E., ... Valette, J. (2014). Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage*, 90, 374–80. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.12.045
- Naver, B., Stub, C., Møller, M., Fenger, K., Hansen, A. K., Hasholt, L., & Sorensen, S. A. (2003). Molecular and Behavioral Analysis of the R6/1 Huntington's Disease Transgenic Mouse. *Neuroscience*, 122, 1049–1057. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.08.053
- Neeman, M., Freyer, J. P., & Sillerud, L. O. (1991). A Simple Method for Obtaining Cross-Term-Free Images for Diffusion Anisotropy Studies in NMR Microimaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 21, 138–143.
- NicNiocaill, B., Haraldsson, B., Hansson, O., O'Connor, W. T., & Brundin, P. (2001). Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, 13, 206–210.
- Nilsson, M., Westen, D. Van, Stahlberg, F., Sundgren, P. C., & Latt, J. (2013). The role of tissue microstructure and water exchange in biophysical modelling of diffusion in white matter. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 26, 345–370. doi:10.1007/s10334-013-0371-x

- Nilsson, P., & Ponten, U. (1990). Changes in Cortical Extracellular Levels of Energy-Related Metabolites and Amino Acids Following Concussive Brain Injury in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 10, 631–637.
- Novikov, D. S., & Kiselev, V. G. (2011). Surface-to-volume ratio with oscillating gradients. *Journal of Magnetic Resonance*, 210(1), 141–145. doi:10.1016/j.jmr.2011.02.011
- Ordidge, R. J., Connelly, A., & Lohman, J. A. B. (1986). Image-Selected in Viva Spectroscopy (ISIS). A New Technique for Spatially Selective NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 66, 283–294.
- Ordidge, R. J., Wylezinska, M., Hugg, J. W., Butterworth, E., & Franconi, F. (1996). Frequency Offset Corrected Inversion (FOCI) Pulses for Use in Localized Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 36, 562–566.
- Öz, G., & Tkac, I. (2011). Short-Echo , Single-Shot , Full-Intensity Proton Magnetic Resonance Spectroscopy for Neurochemical Profiling at 4 T : Validation in the Cerebellum and Brainstem. *Magnetic Resonance in Medicine*, 65, 901–910. doi:10.1002/mrm.22708
- Palombo, M., Ligneul, C., Hernandez-Garzon, E., & Valette, J. (2017). Can we detect the effect of spines and leaflets on the diffusion of brain intracellular metabolites ? *NeuroImage*, (May). doi:10.1016/j.neuroimage.2017.05.003
- Palombo, M., Ligneul, C., Najac, C., Le, J., Flament, J., & Escartin, C. (2016). New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24), 6671–6676. doi:10.1073/pnas.1504327113
- Palombo, M., Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Modeling Diffusion of Intracellular Metabolites in the Mouse Brain up to Very High Diffusion-Weighting : Diffusion in Long Fibers ( Almost ) Accounts for Non-Monoexponential Attenuation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 350(November 2016), 343–350. doi:10.1002/mrm.26548
- Parsons, E. C., Does, M. D., & Gore, J. C. (2003). Modified oscillating gradient pulses for direct sampling of the diffusion spectrum suitable for imaging sequences. *Magnetic Resonance Imaging*, 21, 279–285. doi:10.1016/S0730-725X(03)00155-3
- Parsons, E. C., Does, M. D., & Gore, J. C. (2006). Temporal diffusion spectroscopy: theory and implementation in restricted systems using oscillating gradients. *Magnetic Resonance in Medicine*, 55(1), 75–84. doi:10.1002/mrm.20732
- Pavese, N., Gerhard, A., Tai, Y. F., Ho, A. K., Turkheimer, F., Barker, R. A., ... Piccini, P. (2006). Microglial activation correlates with severity in Huntington disease A clinical and PET study. *Neurology*, 66, 1638–1643.
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., ... Fu, Z. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472(7344), 437–442. doi:10.1038/nature09965.Shank3

- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P. J. (2007). Activity-Dependent Regulation of Energy Metabolism by Astrocytes : An Update. *Glia*, 1262(April), 1251–1262. doi:10.1002/glia
- Pellerin, L., & 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*, 91, 10625–10629.
- Pépin, J., Francelle, L., Carrillo-de Sauvage, M., Longprez, L. De, Gipchtein, P., Cambon, K., ... Flament, J. (2016). In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage*, 139, 53–64. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.06.023
- Pfeuffer, J., Flo, U., Dreher, W., & Leibfritz, D. (1998). Restricted diffusion and exchange of intracellular water : theoretical modelling and diffusion time dependence of 1 H NMR measurements on perfused glial cells. *NMR in Biomedicine*, 31, 19–31.
- Pfeuffer, J., Thic, I., & Gruetter, R. (2000). Extracellular-Intracellular Distribution of Glucose and Lactate in the Rat Brain Assessed Noninvasively by Diffusion-Weighted IH Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy In Vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20, 736–746.
- Povazan, M., Hangel, G., Strasser, B., Gruber, S., Chmelik, M., Trattnig, S., & Bogner, W. (2015). NeuroImage Mapping of brain macromolecules and their use for spectral processing of H-MRSI data with an ultra-short acquisition delay at 7 T. *NeuroImage*, 121, 126–135. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.07.042
- Provencher, S. W. (1993). Estimation of Metabolite Concentrations from Localized in Vivo Proton NMR Spectra. *Magnetic Resonance in Medicine*, 30(7), 672–679.
- Purcell, E. M., Torrey, H. C., & Pound, R. V. (1946). Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*.
- Quintanilla, R. A., & Johnson, G. V. W. (2009). Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*, 80, 242–247. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.07.010
- Ratray, I., Smith, E. J., Crum, W. R., Walker, T. A., Gale, R., Bates, G. P., & Modo, M. (2013). Correlations of Behavioral Deficits with Brain Pathology Assessed through Longitudinal MRI and Histopathology in the R6/1 Mouse Model of Huntington's Disease. *PloS One*, 8(12), 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0084726
- Reynaud, O., Winters, K. V., Hoang, D. M., Wadghiri, Y. Z., Novikov, D. S., & Kim, S. G. (2015). Surface-to-volume ratio mapping of tumor microstructure using oscillating gradient diffusion weighted imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 00(April), 1–11. doi:10.1002/mrm.25865
- Ronen, I., Budde, M., Ercan, E., Annese, J., Techawiboonwong, A., & Webb, A. (2014). Microstructural organization of axons in the human corpus callosum quantified by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of N -acetylaspartate and post-mortem histology. *Brain Structure & Function*, 219, 1773–1785. doi:10.1007/s00429-013-0600-0

- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease : from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, 10(1), 83–98. doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., ... Welty, D. F. (1996). Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron*, 16, 675–686.
- Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., ... DiFglia, M. (2001). Early and Progressive Accumulation of Reactive Microglia in the Huntington Disease Brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(02), 161–172.
- Schwab, C., Klegeris, A., & Mcgeer, P. L. (2010). Biochimica et Biophysica Acta In fl ammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1802(10), 889–902. doi:10.1016/j.bbadis.2009.10.013
- Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R. A., & Thoenen, H. (1994). Ciliary Neurotrophic Factor. *Journal of Neurobiology*, 25(11), 1436–1453.
- Shemesh, N., Ozarslan, E., Komlosh, M. E., Basser, P. J., & Cohen, Y. (2010). From single-pulsed field gradient to double-pulsed field gradient MR : gleanng new microstructural information and developing new forms of contrast in MRI y. *NMR in Biomedicine*, 23, 757–780. doi:10.1002/nbm.1550
- Shemesh, N., Rosenberg, J. T., Dumez, J.-N., Grant, S. C., & Frydman, L. (2014). Metabolic T1 dynamics and longitudinal relaxation enhancement in vivo at ultrahigh magnetic fields on ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(11), 1810–7. doi:10.1038/jcbfm.2014.149
- Shimohama, S., Rosenberg, M. B., Fagan, A. M., Wolff, J. A., & Short, M. P. (1989). Grafting genetically modified cells into the rat brain : characteristics of E . coli beta-galactosidase as a reporter gene. *Molecular Brain Research*, 5, 271–278.
- Simmons, D. A., Casale, M., Alcon, B., Pham, N. H. A., Narayan, N., & Lynch, G. (2007). Ferritin Accumulation in Dystrophic Microglia is an Early Event in the Development of Huntington's Disease. *Glia*, 55, 1074–1084. doi:10.1002/glia
- Simmons, M. L., Frondoza, C. G., & Coyle, J. T. (1991). IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF N-ACETYL-ASPARTATE WITH MONOCLONAL ANTIBODIES. *Neuroscience*, 45(1), 37–45.
- Snoussi, K., Gillen, J. S., Horska, A., Puts, N. A. J., Pradhan, S., Edden, R. A. E., & Barker, P. B. (2015). Comparison of Brain Gray and White Matter Macromolecule Resonances at 3 and 7 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*, 613, 607–613. doi:10.1002/mrm.25468
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Solis, J. M., Herranz, A. S., Herreras, O., Lerma, J., & Martin, R. (1988). Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain ? *Neuroscience Letters*, 91, 53–58.

Spees, W. M., Song, S.-K., Garbow, J. R., Neil, J. J., & Ackerman, J. J. (2012). Use of Ethylene Glycol to Evaluate Gradient Performance in Gradient-Intensive Diffusion MR Sequences. *Magnetic Resonance in Medicine*, 68, 319–324.

Spires, T. L., Grote, A. H. E., Garry, S., Cordery, P. M., Dellen, A. Van, Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2004). Dendritic spine pathology and deficits in experience-dependent dendritic plasticity in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, 19(January), 2799–2807. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03374.x

Stejskal, E. O., & Tanner, J. E. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1), 288–292. doi:10.1063/1.1695690

Stepisnik, J. (1981). Analysis of NMR self-diffusion measurements by a density matrix calculation. *Physica B*, 350–364.

Stepisnik, J. (1985). Measuring and imaging of flow by nmr. *Progress in NMR Spectroscopy*, 17, 187–209.

Stöckli, K. A., Lillien, L. E., Breitfeld, G., Hughes, R. A., Raff, M. C., Thoenen, H., & Sendtner, M. (1991). Regional Distribution, Developmental Changes, and Cellular Localization of CNTF-mRNA and Protein in the Rat Brain. *The Journal of Cell Biology*, 115(2), 447–459.

Strange, K., Emma, F., Paredes, A., & Morrison, R. (1994). Osmoregulatory Changes in Myo-inositol Content and Na<sup>+</sup>/Myo-Inositol Cotransport in Rat Cortical Astrocytes. *Glia*, 12, 35–43.

Streit, W. J., Braak, H., Xue, Q.-S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118, 475–485. doi:10.1007/s00401-009-0556-6

Suárez, I., Bodega, G., & Fernández, B. (2002). Glutamine synthetase in brain : effect of ammonia. *Neurochemistry International*, 41, 123–142.

Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., & Alberini, C. M. (2011). Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. *Cell*, 144(5), 810–823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018

Tai, F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S. J., Barker, R. A., Brooks, D. J., & Piccini, P. (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*, 130, 1759–1766. doi:10.1093/brain/awm044

Taylor, D. L., Davies, S. E. C., Obrenovitch, T. P., Doheny, H., Patsalos, N., Clark, J. B., & Symon, L. (1995). Investigation into the Role of N-Acetylaspartate in Cerebral Osmoregulation. *Journal of Neurochemistry*, 65(1), 275–281.

Taylor, D. L., Davies, S. E. C., Obrenovitch, T. P., Urenjak, T., Richards, D. A., Clark, J. B., & Symon, L. (1994). Extracellular N-Acetylaspartate in the Rat Brain : In Vivo Determination of Basal Levels and Changes Evoked by High K<sup>+</sup>. *Journal of Neurochemistry*, 62, 2349–2355.



- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell*, 72, 971–983.
- Thurston, J. H., Sherman, W. R., Hauhart, R. E., & Kloepper, R. F. (1989). myo-Inositol : A Newly Identified Nonnitrogenous Osmoregulatory Molecule in Mammalian Brain. *Pediatric Research*, 26(5), 482–485.
- Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D., Yan, S., ... Przedborski, S. (2003). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(6). doi:10.1172/JCI200318797.Introduction
- Tiret, B., Sauvage, M. C., Nguyen, H. P., El Massioui, N., Lebon, V., Brouillet, E., & Valette, J. (2016). Remodeling of energy metabolism revealed by 31P magnetization transfer in a transgenic rat model of Huntington's disease. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 24* (p. 0020).
- Tkac, I., Dubinsky, J. M., Keene, C. D., Gruetter, R., & Low, W. C. (2007). Neurochemical changes in Huntington R6 / 2 mouse striatum detected by in vivo 1 H NMR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry*, 100, 1397–1406. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04323.x
- Tkac, I., Henry, P., Andersen, P., Keene, C. D., Low, W. C., & Gruetter, R. (2004). Highly Resolved In Vivo 1 H NMR Spectroscopy of the Mouse Brain at 9.4 T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 484(December 2003), 478–484. doi:10.1002/mrm.20184
- Tkac, I., Starcuk, Z., Choi, I., & Gruetter, R. (1999). In Vivo 1 H NMR Spectroscopy of Rat Brain at 1 ms Echo Time. *Magnetic Resonance in Medicine*, 41, 649–656.
- Torrey, H. C. (1956). Bloch Equations with Diffusion Terms. *Physical Review*, 104(3), 563–565.
- Tossman, U., & Ungerstedt, U. (1986). Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica*, 128(1981), 9–14.
- Uhlenbeck, G. E., & Goudsmit, S. (1926). Spinning Electrons and the Structure of Spectra. *Nature*, 117, 264–265.
- Urenjak, J., Williams, S. R., Gadian, D. G., & Noble, M. (1992). Specific Expression of N-Acetylaspartate in Neurons , Oligodendrocyte-Type-2 Astrocyte Progenitors , and Immature Oligodendrocytes In Vitro. *Journal of Neurochemistry*, 59, 55–61.
- Urenjak, J., Williams, S. R., Gadian, D. G., & Noble, M. (1993). Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Unambiguously Identifies Different Neural Cell Types. *The Journal of Neuroscience*, 13(March), 981–989.
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Boumezbeur, F., Hantraye, P., & Lebon, V. (2005). Optimized diffusion-weighted spectroscopy for measuring brain glutamate apparent diffusion coefficient on a whole-body MR system. *NMR in Biomedicine*, 2(September), 527–533. doi:10.1002/nbm.985

- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Hantraye, P., Bloch, G., & Lebon, V. (2007). Isoflurane strongly affects the diffusion of intracellular metabolites, as shown by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of the monkey brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27, 588–596. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600353
- Van, A. T., Holdsworth, S. J., & Bammer, R. (2014). In vivo investigation of restricted diffusion in the human brain with optimized oscillating diffusion gradient encoding. *Magnetic Resonance in Medicine*, 71(1), 83–94. doi:10.1002/mrm.24632
- Van Dellen, A., Welch, J., Dixon, R. M., Cordery, P., York, D., Styles, P., ... Hannan, A. J. (2000). N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *NeuroReport*, 11(17), 3751–3757.
- Wang, X., Sarkar, A., Cicchetti, F., Yu, M., Zhu, A., Jokivarsi, K., ... Brownell, A. (2005). Cerebral PET imaging and histological evidence of transglutaminase inhibitor cystamine induced neuroprotection in transgenic R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 231, 57–66. doi:10.1016/j.jns.2004.12.011
- Wick, M., Nagatomo, Y., Prielmeier, F., & Frahm, J. (1995). Alteration of Intracellular Metabolite Diffusion in Rat Brain In Vivo During Ischemia and Reperfusion. *Stroke*, 26, 1930–1934.
- Xin, L., Gambarota, G., Cudalbu, C., Mlynarik, V., & Gruetter, R. (2013). Single spin-echo T2 relaxation times of cerebral metabolites at 14.1 T in the in vivo rat brain. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 26, 549–554. doi:10.1007/s10334-013-0378-3
- Xin, L., Gambarota, G., Mlynarik, V., & Gruetter, R. (2008). Proton T2 relaxation time of J-coupled cerebral metabolites in rat brain at 9.4 T. *NMR in Biomedicine*, 21, 396–401. doi:10.1002/nbm
- Xu, J., Li, K., Smith, R. A., Waterton, J. C., Zhao, P., Chen, H., ... Gore, J. C. (2012). Characterizing Tumor Response to Chemotherapy at Various Length Scales Using Temporal Diffusion Spectroscopy. *PloS One*, 7(7). doi:10.1371/journal.pone.0041714
- Yamaguchi, M., Chen, S., & Hatefi, Y. (1986). Amino acid sequence of the nucleotide-binding site of D-(-)-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase labeled with arylazido-beta-[3- $^3\text{H}$ ]alanyl nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry*, 25(17), 4864–8.
- Yongbi, N. M., Payne, G. S., Collins, D. J., & Leach, M. O. (1995). Quantification of signal selection efficiency, extra volume suppression and contamination for ISIS, STEAM and PRESS localized  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy using an EEC localization test object. *Physics in Medicine & Biology*, 40, 1293–1303.
- Zacharoff, L., Tkac, I., Song, Q., Tang, C., Bolan, P. J., Mangia, S., ... Dubinsky, J. M. (2011). Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1–13. doi:10.1038/jcbfm.2011.157
- Zala, D., Bensadoun, J., Almeida, P. De, Leavitt, B. R., Gutekunst, C., Aebischer, P., ... De, N. (2004). Long-term lentiviral-mediated expression of ciliary neurotrophic factor in the striatum of Huntington's disease transgenic mice. *Experimental Neurology*, 185, 26–35. doi:10.1016/j.expneurol.2003.09.002

Zhang, S. F., Hennessey, T., Yang, L., Starkova, N. N., Beal, M. F., & Starkov, A. A. (2011). Impaired Brain Creatine Kinase Activity in Huntington's Disease. *Neurodegenerative Diseases*, 8, 194–201.  
doi:10.1159/000321681

Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. (2004). Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. *Neuron*, 44, 749–757.

Zimmer, E. R., Parent, M. J., Souza, D. G., Leuzy, A., Lecrux, C., Kim, H., ... Rosa-neto, P. (2017). [18F] FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nature Neuroscience*, 20(3).  
doi:10.1038/nn.4492

## LISTE DES PUBLICATIONS

---

### Articles scientifiques

- Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2017). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(4), 1390–1398. doi:10.1002/mrm.26217
- Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and “short”-echo-time diffusion-weighted MRS. *NMR in Biomedicine*, 30(1), 1–10. doi:10.1002/nbm.3671
- Palombo, M., Ligneul, C., Najac, C., Le, J., Flament, J., & Escartin, C. (2016). New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24), 6671–6676. doi:10.1073/pnas.1504327113
- Palombo, M., Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Modeling Diffusion of Intracellular Metabolites in the Mouse Brain up to Very High Diffusion-Weighting : Diffusion in Long Fibers ( Almost ) Accounts for Non-Monoexponential Attenuation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 350(November 2016), 343–350. doi:10.1002/mrm.26548
- Palombo, M., Ligneul, C., Hernandez-Garzon, E., & Valette, J. (2017). Can we detect the effect of spines and leaflets on the diffusion of brain intracellular metabolites ? *NeuroImage*, (May). doi:10.1016/j.neuroimage.2017.05.003

### Communications en congrès

- Ligneul, C., Najac, C., Flament, J., & Valette, J. (2015). Probing metabolite diffusion at ultra-short diffusion times in the mouse brain using optimized oscillating gradients and a “short” echo time strategy. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 23* (Vol. 32, p. 0616).
- Ligneul, C., Palombo, M., Le Douce, J., Jego, P., Guillermier, M., Bonvento, G., & Valette, J. (2016). Assessing metabolic and structural alterations of brain cells in the APP/PS1/tauP301L mouse model of Alzheimer’s disease using MRS and diffusion-weighted MRS in vivo. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 24*.
- Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2016). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: revisiting the correlation between relaxation and diffusion properties. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 24*.
- Ligneul, C., Palombo, M., Flament, J., & Valette, J. (2017). Approaching free intracellular diffusion by diffusion-weighted MRS at ultra-short time scales : initial results in the rodent brain using a 1.5 T/m gradient. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 25* (Vol. 71, p. 1082).

Ligneul, C., Palombo, M., Hernandez-Garzon, E., Guillermier, M., Bernier, S., Ceyzeriat, K., ... Valette, J. (2017). Probing alterations of cellular metabolism and structure in CNTF-induced mouse model of astrocytic activation using in vivo MRS and diffusion-weighted MRS. In *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 25* (p. 0410). doi:10.1002/mrm.26217

# Metabolite Diffusion up to Very High $b$ in the Mouse Brain In Vivo: Revisiting the Potential Correlation between Relaxation and Diffusion Properties

Clémence Ligneul,<sup>1,2</sup> Marco Palombo,<sup>1,2</sup> and Julien Valette<sup>1,2\*</sup>

**Purpose:** To assess the potential correlation between metabolites diffusion and relaxation in the mouse brain, which is of importance for interpreting and modeling metabolite diffusion based on pure geometry, irrespective of relaxation properties (multicompartmental relaxation or surface relaxivity).

**Methods:** A new diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy sequence is introduced, dubbed “STE-LASER,” which presents several nice properties, in particular the absence of cross-terms with selection gradients and a very clean localization. Metabolite diffusion is then measured in a large voxel in the mouse brain at 11.7 Tesla using a cryoprobe, resulting in excellent signal-to-noise ratio, up to very high  $b$ -values under different echo time, mixing time, and diffusion time combinations.

**Results:** Our results suggest that the correlation between relaxation and diffusion properties is extremely small or even nonexistent for metabolites in the mouse brain.

**Conclusion:** The present work strongly supports the interpretation and modeling of metabolite diffusion primarily based on geometry, irrespective of relaxation properties, at least under current experimental conditions. **Magn Reson Med 000:000–000, 2016. © 2016 The Authors Magnetic Resonance in Medicine published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of International Society for Magnetic Resonance in Medicine. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.**

**Key words:** magnetic resonance spectroscopy; metabolite; diffusion; relaxation; brain

## INTRODUCTION

The diffusion of brain endogenous metabolites, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy (DW-MRS), has the enormous potential to yield specific information about the intracellular environment, due to the cell-specific compartmentation of most metabolites (for review, see Nicolay et al) (1). In recent works, we and others have interpreted and modeled brain metabolite diffusion in vivo in terms of cell microstructure/geometry (2–7), as also usually done for water diffusion. This is assuming that diffusion attenuation mainly results from the geometry, irrespective of the potential correlation that might exist between relaxation time and diffusion. Such correlation may of course arise from the presence of different compartments, each with their own relaxation times and diffusion properties (e.g., cytosolic versus mitochondrial compartments). If only a single compartment exists, correlation between relaxation and measured diffusion can still arise from surface (or wall) relaxivity, i.e., where each interaction of a metabolite with a cellular membrane leads to a quicker relaxation [this has been recognized for a long time in NMR of porous media (8,9)]. A few works have reported a dependency of brain metabolite signal attenuation on the echo time, suggesting that such a correlation might exist and be significant (10–12), as also reported for water (13,14). It is thus legitimate to question the validity of interpreting and modeling intracellular metabolite diffusion based on pure geometry, irrespective of relaxation properties.

Here, we propose to revisit the potential relation between metabolite diffusion and relaxation by taking advantage of new methodological features. First, a new sequence is introduced, which presents several nice properties, in particular the absence of cross-terms with selection gradients (resulting in the possibility to modify sequence timing without any bias resulting from variations in cross-terms) and a very clean localization. Metabolite diffusion is then measured in a large voxel in the mouse brain at 11.7 Tesla (T) using a cryoprobe, resulting in excellent signal-to-noise ratio (SNR). Using this setup, we measure metabolite diffusion up to very high  $b$ -values under different echo time (TE), mixing time (TM), and diffusion time ( $\Delta$ ) combinations. Our results suggest that, under these experimental conditions, the correlation between relaxation and diffusion properties is extremely small or even nonexistent.

<sup>1</sup>Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut d’Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses, France.

Grant sponsor: the European Research Council; Grant number: “INCELL” project, ERC grant 336331.

\*Correspondence to: Julien Valette, Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Bâtiment 61, 8 Route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: julien.valette@cea.fr

Received 17 November 2015; revised 26 January 2016; accepted 23 February 2016

DOI 10.1002/mrm.26217

Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). © 2016 The Authors Magnetic Resonance in Medicine published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of International Society for Magnetic Resonance in Medicine. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

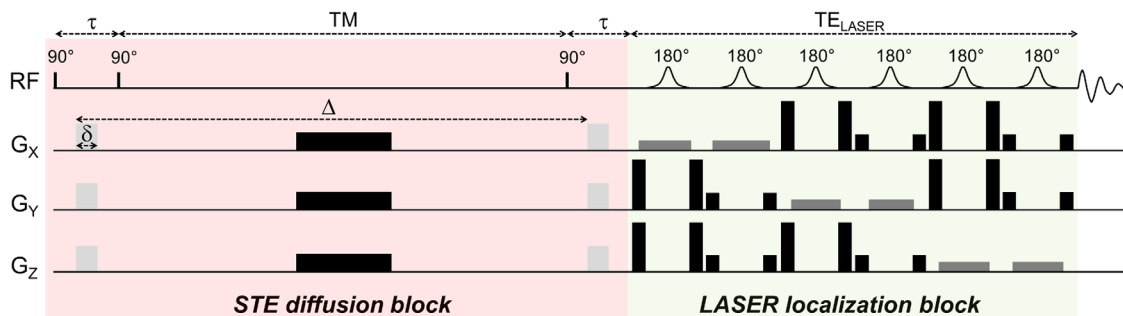


FIG. 1. Outline of the diffusion-weighted STE-LASER sequence. The sequence starts by an STE block, where the  $90^\circ$  are achieved by nonselective 100- $\mu$ s hard pulses. The STE block includes diffusion-weighting gradients (light gray) of duration  $\delta$  and separated by  $\Delta$ . These diffusion gradients are also used as spoilers to ensure that, when combined with the spoiler inserted during the mixing time (in black), only the stimulated echo is preserved at the end of the block. The sequence is then continued by a LASER localization block, just before acquisition. Because they are isolated from each other (diffusion gradients moment is zero when the LASER block starts), there is no cross-term between diffusion gradients and selection gradients. Total  $TE = 2\tau + TE_{LASER}$ .

## METHODS

### DW-MRS Sequence

Cross-terms, which arise from the integral of the product of diffusion gradients' moment with other gradients' moment, result in variations of the effective amplitude and direction of diffusion-weighting, compared with the nominal diffusion-weighting computed based solely on diffusion gradients. Although cross-terms can be taken into account by exact calculation of the whole  $b$ -matrix, this can be quite tedious, and the situation remains complex in an anisotropic medium because, due to cross-terms, diffusion will not be measured along exactly the same directions when the diffusion gradient amplitude or timing vary. Using a cross-term free sequence would allow being sure to get rid of this potential source of bias.

To intrinsically avoid cross-terms between diffusion gradients and selection gradients, we propose to build a sequence following the approach recently proposed by Shemesh et al (15), i.e., by separating the diffusion module from the localization module. However, unlike in Shemesh et al (15), here the diffusion module consists in a stimulated echo (STE) block performed with nonselective hard pulses. Although this does not provide relaxation-enhancement, it allows reaching much shorter echo times and observing more metabolites, including J-coupled ones, and in the meantime reaching very high diffusion-weighting  $b$  or very long diffusion time  $\Delta$  (note that in this study we will consider that gradient duration  $\delta$  is short compared with gradient separation  $\Delta$ , so we will assimilate the diffusion time  $\Delta - \delta/3$  to  $\Delta$ , although for  $b$  calculation the actual  $\Delta - \delta/3$  value is used). We will write the duration of the STE echo time as  $2\tau$ ,  $\tau$  being the time between the centers of the first two  $90^\circ$  pulses.

Spoiling during the TE of the STE block is performed by the diffusion gradients (which, therefore, must always be kept higher than a minimal value, resulting in a minimal  $b$ -value). During the TM, a long spoiler is inserted, which does not contribute to diffusion-weighting or cross-terms. The localization module coming just after the diffusion module is a LASER (“Localization by Adiabatic Selective Refocusing”) block consisting in a train of six adiabatic full passage pulses with adequate slice selection and

spoiler gradients (16). Because the diffusion gradient moment at the end of the STE block has been brought back to zero, there is no cross-term with the gradients of the localization module. The LASER gradients have a small contribution to diffusion-weighting, but this contribution is totally independent of the STE module and is, therefore, constant whatever the diffusion gradient strength or the STE timing. The total TE is of course increased and is  $TE = 2\tau + TE_{LASER}$ . This “STE-LASER” sequence is represented on Figure 1.

Using this sequence, it is straightforward to increase  $\Delta$  by increasing TM. We can also change  $\tau$  and TM while keeping  $\Delta$  constant, as illustrated on Figure 2. Starting from a combination of values  $\tau = \tau_1$  and  $TM = TM_1$  as illustrated on Figure 2A, one can increase  $\tau$  (and consequently TE) to  $\tau = \tau_2$  without changing TM and  $\Delta$ , by simply increasing the delay between the first  $90^\circ$  pulse and the first diffusion gradient lobe, and symmetrically the delay between the second diffusion gradient lobe

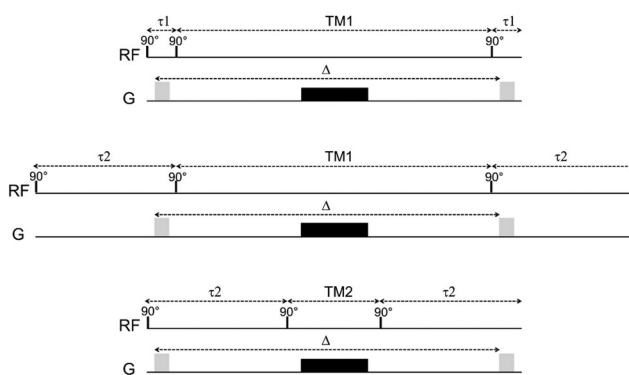


FIG. 2. TE and TM can be varied in the STE block without affecting the diffusion gradients. For simplicity, only one gradient axis is represented, and the LASER block following the STE block is not shown (keeping in mind that it remains unchanged in all situations). From a situation  $\tau = \tau_1$  and  $TM = TM_1$  (top), the echo time is increased by increasing  $\tau$  to  $\tau_2$  by inserting dead times *outside* the diffusion gradient pair, which leaves TM and  $\Delta$  unchanged (middle). Then, keeping  $\tau = \tau_2$ , TM can be reduced down to  $TM_2 = TM_1 - 2 \times (\tau_2 - \tau_1)$  by now inserting dead times *between* the diffusion gradient lobes (but still during the echo time), and reducing TM accordingly to keep  $\Delta$  unchanged (bottom).

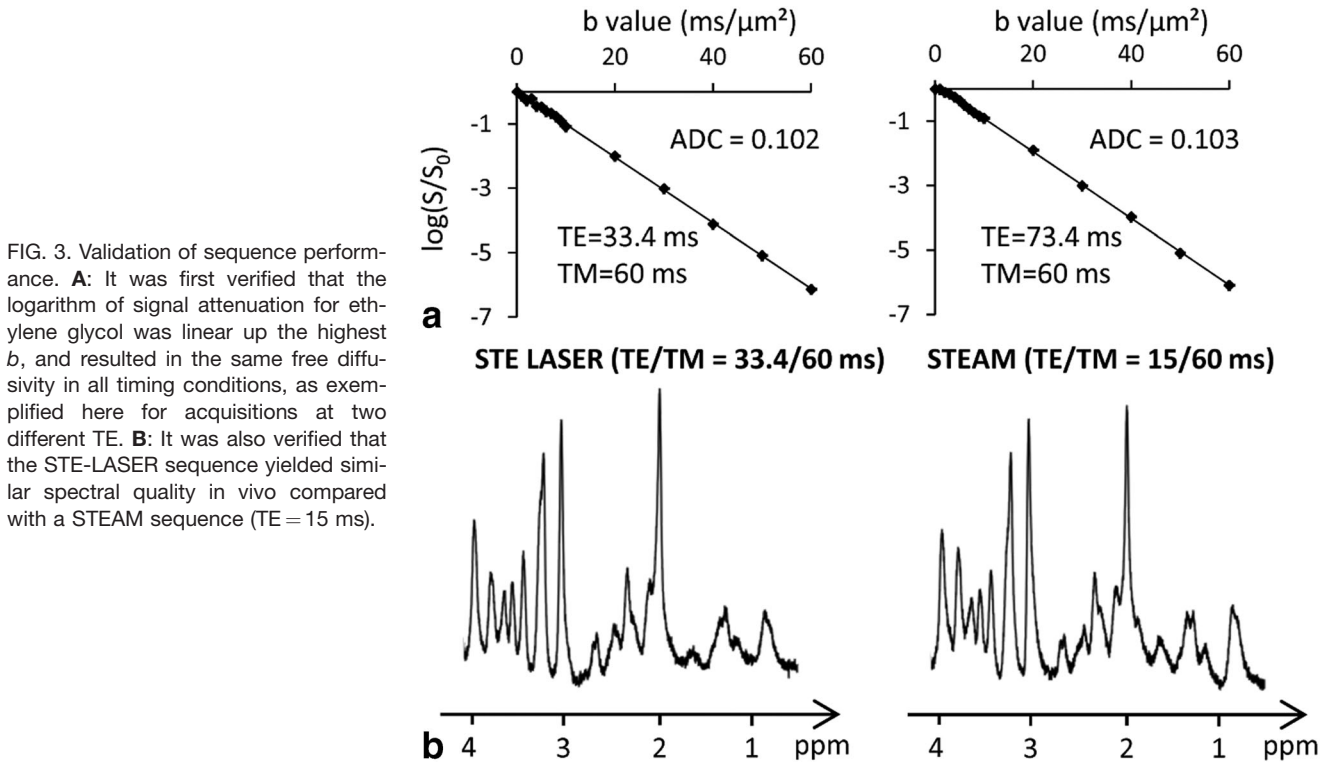


FIG. 3. Validation of sequence performance. **A**: It was first verified that the logarithm of signal attenuation for ethylene glycol was linear up the highest  $b$ , and resulted in the same free diffusivity in all timing conditions, as exemplified here for acquisitions at two different TE. **B**: It was also verified that the STE-LASER sequence yielded similar spectral quality in vivo compared with a STEAM sequence ( $\text{TE} = 15$  ms).

and the LASER block (Fig. 2B). It is then possible to decrease the TM value to  $\text{TM} = \text{TM}_2$  while keeping  $\tau$  (consequently TE) and  $\Delta$  constant, by now moving the extra echo time after the first gradient lobe and before the second gradient lobe and reducing TM accordingly (Fig. 2C). While  $\tau$  and TM are changed, the diffusion gradients are kept absolutely unchanged.

### NMR Setup and Experiments

Experiments were performed on a horizontal 11.7 T Bruker scanner running with Paravision 6.0 (Bruker, Ettlingen, Germany). The maximal gradient strength is  $G_{\text{max}} = 752$  mT/m on each axis, with 100- $\mu\text{s}$  rise time. A quadrature surface cryoprobe (Bruker, Ettlingen, Germany) was used for radiofrequency transmission and reception.

All experimental procedures were approved by the local Ethics Committee (committee #44, approval #10-057). Experiments were performed on 10 male C57BL/6 mice (weight, 28–30 g). Animals were maintained on a stereotaxic bed with a bite and two ear bars. They were anesthetized with 1.2–1.5% isoflurane in a 1:1 mixture of air and dioxygen (1 L/min total flow rate). Mice temperature was monitored with an endorectal probe and maintained at 37°C with regulated water flow, and respiratory rate was continuously monitored using PC SAM software (Small Animal Instruments, Inc., Stony Brook, NY) during scanning.

Spectroscopic signal (5000 Hz spectral width, with 4096 complex data points sampled) was acquired in a large  $6.0 \times 2.4 \times 5.0$  mm<sup>3</sup> voxel using the STE-LASER sequence introduced in the previous section. Water suppression was achieved by a VAPOR module. The STE block consisted in three 100- $\mu\text{s}$  hard pulse. The hyperbolic secant pulses used for refocusing in LASER had a 2-ms duration (correspond-

ing to 10 kHz bandwidth). Total duration of the LASER module was  $\text{TE}_{\text{LASER}} = 25$  ms, and the diffusion-weighting corresponding to the LASER block [considering that refocusing occurs at the middle of the RF pulses, i.e., at the middle of the volume of interest (17,18)] was  $b_{\text{LASER}} = 0.22$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ , which is negligible and will, therefore, not be considered in the rest of the article.

The different combinations that were tested were  $\Delta = 64.2$  ms with three different TE/TM combinations (33.4/60 ms, 73.4/60 ms, and 73.4/20 ms) and  $\Delta = 254.2$  ms with the three equivalent combinations (33.4/250 ms, 73.4/250 ms, and 73.4/210 ms). Gradient duration  $\delta$  was 3 ms in all conditions. A minimal gradient strength of 19 mT/m was found to achieve good spoiling for stimulated selection, corresponding to minimal  $b$ -value of 0.05  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  at  $\Delta = 64.2$  ms and 0.15  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  at  $\Delta = 254.2$  ms. For each timing combination, the maximal  $b$ -value was identified as the largest  $b$ -value still allowing individual scan phasing using metabolite signal (i.e., lowest SNR for NAA on a single scan of  $\sim 5$  with a line broadening of 3 Hz). This criterion gave us the possibility to go up to  $b = 60$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  (or equivalently 60,000  $\text{s}/\text{mm}^2$  in more usual units) for the short TE acquisitions at the two different  $\Delta$  (each dataset consisted in 16 acquisitions at  $b = 0.05, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ ). For TE/TM/ $\Delta = 73.4/60/64.2$  and 73.4/20/64.2 ms, each dataset consisted in 14 acquisitions between  $b = 0.05$  and 40  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ , and for TE/TM/ $\Delta = 73.4/250/254.2$  and 73.4/210/254.2 ms, each dataset consisted in 13 acquisitions between  $b = 0.15$  and 30  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ . The number of averages was 128 for each  $b$ -value. For each timing, an experimental macromolecule (MM) spectrum was acquired in one mouse (512 averages) using the metabolite nulling technique combined with diffusion-



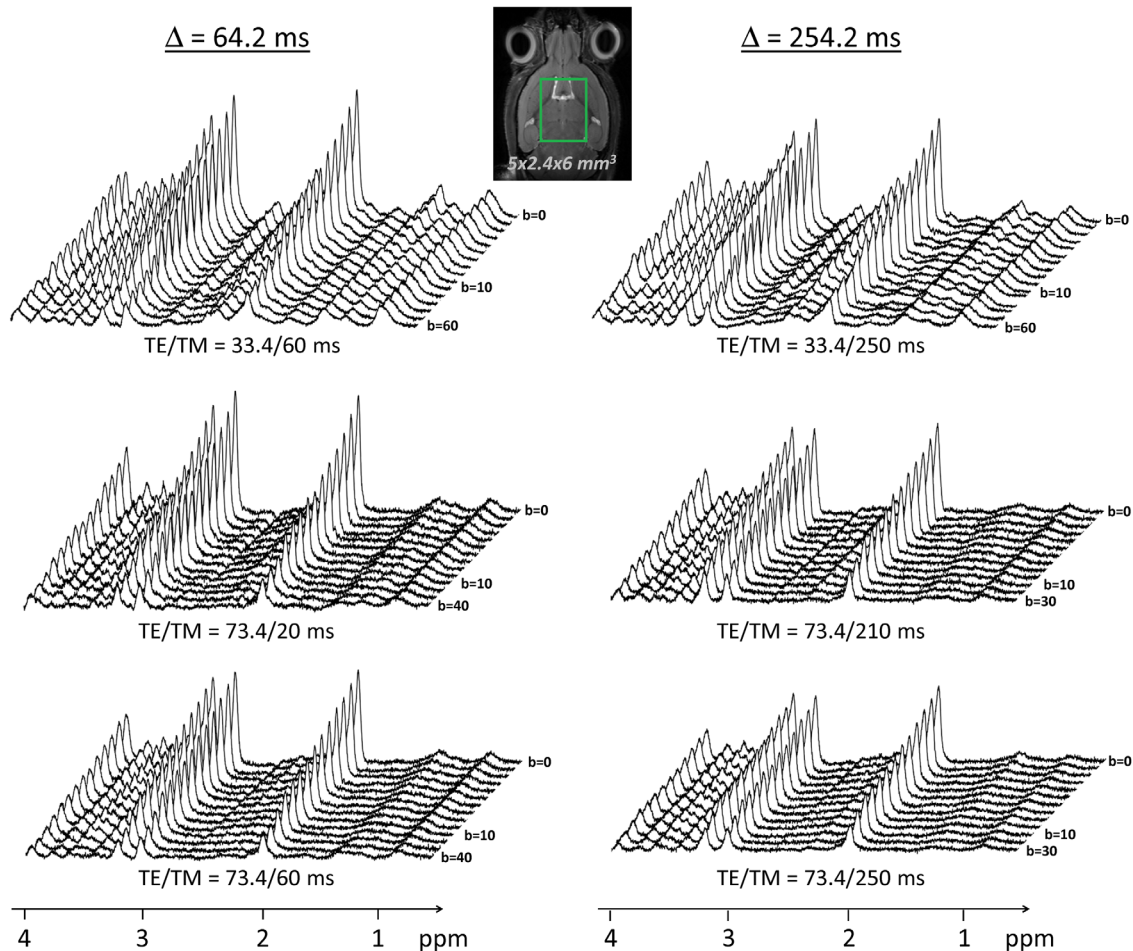


FIG. 4. Typical stack plots of spectra acquired for each TE/TM combination for the two different diffusion times. Each stack plot shown here is acquired in a single experimental session, in a large  $5 \times 2.4 \times 6 \text{ mm}^3$  voxel in the mouse brain. For simplicity the lowest  $b$ -value was noted “ $b=0$ ”, while it is actually slightly higher (see text for details). Note the excellent SNR (no line broadening was applied).

weighting ( $b=10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) to yield cleaner metabolite signal cancellation (19).

The sequence was first validated on an ethylene glycol phantom. Because ethylene glycol has a very high viscosity, signal remains visible even at very high diffusion weighting, which is not the case for water. We could verify that attenuation remained monoexponential up to  $b=60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , and yielded the same diffusion coefficient ( $0.102\text{--}0.105 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) for all timing conditions (e.g., see Figure 3A for the signal attenuation at two different TE). We also checked that the STE-LASER sequence (at minimal TE = 33.4 ms) yielded similar SNR in vivo compared with a more conventional STEAM sequence modified for diffusion-weighting (with a minimal TE of 15 ms) (e.g., as used in Pfeuffer et al) (20). This was indeed the case (Fig. 3B), showing that the extra number of radiofrequency pulses used in STE-LASER does not come at the expense of SNR. Hence, the STE-LASER sequence offers adequate performances in terms of sensitivity and diffusion-weighting.

#### Postprocessing and Data Analysis

Scan-to-scan phase correction was performed on metabolite signal before summing individual scans on Matlab,

to correct for incoherent averaging leading to artefactual signal loss. Eddy current correction was achieved using water reference. Spectra were analyzed with LCModel (21), using a basis set generated with home-made routines based on the density matrix formalism. Chemical shift and J-coupling values for metabolites were taken in Govindaraju et al (22). Signal could be reliably quantified according to our quality standards (Cramér-Rao lower bounds  $\text{CRLB} < 5\%$  at all  $b$ ) for NAA, tCr, tCho, Ins, and Tau for all timing combinations. For the long TE experiments (TE = 73.4 ms, corresponding to four timing combinations), glutamate and glutamine could not be reliably quantified ( $\text{CRLB} > 5\%$ ) and are, therefore, not reported here.

Diffusion was analyzed by calculating the apparent diffusion coefficient (ADC) by log-linear regression up to  $b=5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , and also using biexponential fit up to  $b=30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , corresponding to the highest reachable  $b$ -value for the less favorable timing combinations. The stretched exponent (Kohlrausch–Williams–Watts relaxation functions) did not correctly fit the data at high  $b$ -values and was, therefore, not considered.

Statistical significance of the impact of TE and TM on signal attenuation or diffusion parameters was assessed by an analysis of variance (ANOVA) on two factors (TE and

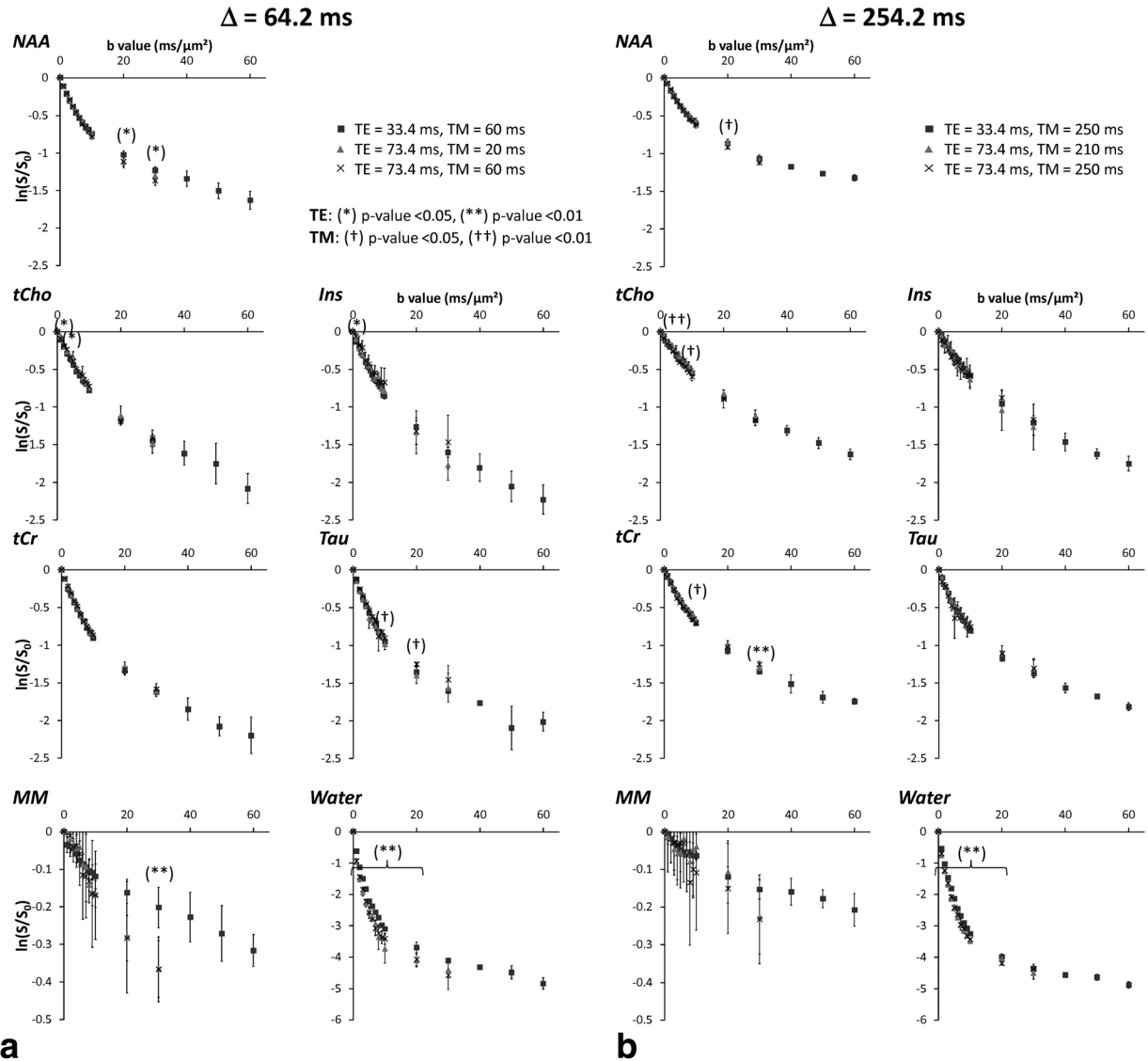


FIG. 5. A,B: Logarithm of signal attenuation for each metabolite and each TE/TM combination at the two different diffusion times, as a function of  $b$ . Error bars stand for the standard deviations determined for four mice. Asterisks indicate significant difference for different TE values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Daggers indicate significant difference for different TM values: † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ .

TM) for each metabolite at  $\Delta = 64.2$  ms and  $\Delta = 254.2$  ms, followed by a post hoc Tukey honest significant difference test on groups exhibiting significant differences extracted from the ANOVA ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

## RESULTS

### Effect of Varying TE and TM on Diffusion Attenuation

Representative spectra at all  $b$ -values and at all TE/TM/ $\Delta$  combinations are shown in Figure 4. Note the very good SNR (SNR = 105 at  $b = 0.050$  and SNR = 30 at  $b = 60$  ms/ $\mu\text{m}^2$  on the NAA peak on the most favorable timing combination, SNR = 78 at  $b = 0.150$  and SNR = 27 at  $b = 30$  ms/ $\mu\text{m}^2$  on the less favorable timing combination). Logarithm of signal attenuation as a function of  $b$ , for each metabolite, is displayed on Figure 5A for  $\Delta = 64.2$  ms, and of Figure 5B for  $\Delta = 254.2$  ms. For each metabolite at each  $\Delta$ , the three different TE/TM conditions are dis-

played on the same plot to facilitate comparison between these conditions.

Generally speaking, the impact of TE and TM is extremely low, whatever  $\Delta$ . Only a few data points exhibit some significant dependency on TE/TM. Many of these data points are isolated, i.e., immediately lower and higher  $b$ -values do not exhibit any significant dependency on TE/TM, suggesting a possible type I error for at least some of these particular  $b$ -values for which dependency on TE/TM was identified. Anyway, for most of these  $b$ -values, signal difference between different TE/TM is less than 5%, which is in general below experimental noise and can, therefore, be considered negligible. The only exceptions are the dependency on TE of NAA attenuation at  $b = 20$  ms/ $\mu\text{m}^2$  and  $30$  ms/ $\mu\text{m}^2$  ( $\sim 7\%$  signal decrease when increasing TE), and the dependency on TM of Tau attenuation at  $b = 20$  ms/ $\mu\text{m}^2$  ( $\sim 13\%$  when decreasing TM). To summarize, we can safely say

Table 1

Results from the Monoexponential and Biexponential Fits for Metabolites, MM, and Water Obtained under the Different TE/TM Combinations for  $\Delta = 64.2$  ms<sup>a</sup>

	Results from fit					
	$\Delta = 64.2$ ms		Monoexponential ADC	Biexponential		
	TE	TM		ADC <sub>fast</sub>	ADC <sub>slow</sub>	f <sub>slow</sub>
NAA	33.4	60	0.097 ± 0.004	0.220 ± 0.023	0.019 ± 0.002	0.51 ± 0.03
	73.4	60	0.095 ± 0.004	0.181 ± 0.034	0.016 ± 0.010	0.44 ± 0.11
	73.4	20	0.094 ± 0.008	0.196 ± 0.029	0.021 ± 0.008	0.48 ± 0.11
tCr	33.4	60	0.109 ± 0.005	0.191 ± 0.033	0.023 ± 0.005	0.40 ± 0.09
	73.4	60	0.106 ± 0.005	0.204 ± 0.056	0.025 ± 0.009	0.43 ± 0.13
	73.4	20	0.101 ± 0.010	0.176 ± 0.041	0.019 ± 0.013	0.36 ± 0.12
tCho	33.4	60	0.091 ± 0.009	0.176 ± 0.011	0.024 ± 0.005	0.48 ± 0.06
	73.4	60	0.078 ± 0.008	0.184 ± 0.056	0.027 ± 0.009	0.52 ± 0.18
	73.4	20	0.082 ± 0.007	0.131 ± 0.035	0.012 ± 0.014	0.34 ± 0.14
Ins	33.4	60	0.098 ± 0.007	0.198 ± 0.034	0.029 ± 0.009	0.49 ± 0.12
	73.4	60	0.094 ± 0.005	0.283 ± 0.151	0.036 ± 0.025	0.59 ± 0.31
	73.4	20	0.086 ± 0.028	0.121 ± 0.006	0.010 ± 0.017	0.30 ± 0.15
Tau	33.4	60	0.118 ± 0.002	0.210 ± 0.033	0.022 ± 0.004	0.39 ± 0.06
	73.4	60	0.128 ± 0.016	0.220 ± 0.030	0.020 ± 0.016	0.38 ± 0.12
	73.4	20	0.112 ± 0.008	0.199 ± 0.033	0.014 ± 0.013	0.37 ± 0.09
MM	33.4	60	0.016 ± 0.005	0.861 ± 1.439	0.003 ± 0.003	0.89 ± 0.04
	73.4	60	0.011 ± 0.014	0.075 ± 0.071	0.010 ± 0.005	0.90 ± 0.05
	73.4	20	0.011 ± 0.007	0.053 ± 0.055	0.008 ± 0.006	0.88 ± 0.15
Water	33.4	60	0.491 ± 0.029 ***	0.649 ± 0.120	0.069 ± 0.028	0.09 ± 0.03*
	73.4	60	0.575 ± 0.010 ***	0.714 ± 0.113	0.048 ± 0.016	0.05 ± 0.02*
	73.4	20	0.568 ± 0.023 ***	0.735 ± 0.078	0.061 ± 0.017	0.06 ± 0.01*

<sup>a</sup>Units in the table are ms and  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Asterisks indicate significant difference for different TE values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ . Daggers indicate significant difference for different TM values: †  $P < 0.05$ . Statistical differences were evaluated using a one-way ANOVA test followed by *post hoc* analysis.

that, under the experimental conditions investigated here, the effect of TE and TM on metabolite diffusion attenuation is presumably very small (if any), with a possible but still ambiguous manifestation only at very high  $b$ -values in a limited number of cases.

We were also able to quantify MM signal attenuation, although quantification was relatively difficult for long TE. When looking at average MM signal, a consistently (i.e., for almost all  $b$ ) stronger decrease is observed as TE is increased, although this decrease is not found to be significant, maybe due to the high measurement SD at long TE (type II error).

The situation is unambiguous for water, where a very significant ( $P < 0.01$ ) dependency on TE is found at almost all  $b$ -values, for both  $\Delta$  investigated: longer TE lead to stronger signal attenuation (no dependency on TM is found). This view is consistent with the existence of water pools with short T2/low diffusivity and long T2/fast diffusivity, e.g., myelin water and cerebrospinal fluid.

#### Effect of Varying TE and TM on Estimated Diffusion Parameters

Table 1 and Table 2 summarize the estimated diffusion parameters derived from data for all metabolites in all conditions, respectively, for  $\Delta = 64.2$  ms and  $\Delta = 254.2$  ms. The variability for some parameters extracted from the biexponential fit is sometimes high, as expected when no a priori is used in the fitting. After ANOVA and *post hoc* analysis, no significant difference is found

for any of the parameters under the various TE/TM combinations, whatever  $\Delta$  or the metabolite considered. This confirms that the effect of TE and TM on metabolite measured diffusion is presumably very small, and maybe nonexistent. This is also true for MM, but the SD is very high, so here it is more difficult to rule out potential type II error. In contrast, diffusion parameters for water exhibit some very significant dependency on TE or TM.

## DISCUSSION

### Diffusion Properties of Metabolites in the Mouse Brain

Metabolite ADC measured here are in good agreement with measurements performed in the rat or monkey brain or in the human gray matter at intermediate/long diffusion times (higher than a few tens of ms) with state-of-the-art postprocessing (scan-to-scan phasing and MM quantification), i.e., in the order of 0.1–0.15  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  [e.g., (6,7,20,23,24)]. Note that, in the present study, measured ADCs are generally in the lower range of (or slightly below) previously reported ADC. The linearity of signal logarithm attenuation in the  $b = 0$ –5  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  range is very good for all metabolites in all TE/TM/ $\Delta$  conditions ( $R^2 > 0.99$  in most situations, worst case for tCho at long TE where  $R^2 = 0.96$ , but SNR is lower).

In this work, we analyzed the diffusion properties in the range  $b = 0$ –30  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  using biexponential fitting. As far as we know, this can be compared with only one pioneering study where metabolite diffusion was measured

Table 2

Results from the Monoexponential and Biexponential Fits for Metabolites, MM, and Water Obtained under the Different TE/TM Combinations for  $\Delta = 254.2 \text{ ms}^a$

	$\Delta = 254.2 \text{ ms}$		Results from fit			
	TE	TM	Monoexponential ADC	Biexponential		
				$ADC_{fast}$	$ADC_{slow}$	$f_{slow}$
NAA	33.4	250	$0.077 \pm 0.003$	$0.202 \pm 0.027$	$0.018 \pm 0.002$	$0.59 \pm 0.04$
	73.4	210	$0.073 \pm 0.004$	$0.202 \pm 0.045$	$0.019 \pm 0.005$	$0.61 \pm 0.09$
	73.4	250	$0.076 \pm 0.006$	$0.164 \pm 0.019$	$0.016 \pm 0.002$	$0.52 \pm 0.02$
tCr	33.4	250	$0.083 \pm 0.012$	$0.172 \pm 0.044$	$0.022 \pm 0.005$	$0.50 \pm 0.08$
	73.4	210	$0.081 \pm 0.007$	$0.213 \pm 0.028$	$0.027 \pm 0.004$	$0.63 \pm 0.07$
	73.4	250	$0.089 \pm 0.001$	$0.191 \pm 0.029$	$0.020 \pm 0.004$	$0.51 \pm 0.06$
tCho	33.4	250	$0.063 \pm 0.003$	$0.171 \pm 0.046$	$0.025 \pm 0.008$	$0.66 \pm 0.12$
	73.4	210	$0.057 \pm 0.011$	$0.168 \pm 0.059$	$0.025 \pm 0.008$	$0.70 \pm 0.13$
	73.4	250	$0.062 \pm 0.014$	$0.154 \pm 0.067$	$0.017 \pm 0.013$	$0.53 \pm 0.22$
Ins	33.4	250	$0.063 \pm 0.012$	$0.125 \pm 0.051$	$0.013 \pm 0.015$	$0.43 \pm 0.20$
	73.4	210	$0.066 \pm 0.018$	$0.111 \pm 0.047$	$0.009 \pm 0.009$	$0.34 \pm 0.16$
	73.4	250	$0.081 \pm 0.006$	$0.385 \pm 0.333$	$0.024 \pm 0.014$	$0.67 \pm 0.17$
Tau	33.4	250	$0.101 \pm 0.003$	$0.190 \pm 0.030$	$0.018 \pm 0.009$	$0.43 \pm 0.09$
	73.4	210	$0.097 \pm 0.005$	$0.222 \pm 0.065$	$0.019 \pm 0.014$	$0.49 \pm 0.15$
	73.4	250	$0.122 \pm 0.026$	$0.302 \pm 0.068$	$0.025 \pm 0.004$	$0.56 \pm 0.04$
MM	33.4	250	$0.009 \pm 0.003$	$0.291 \pm 0.308$	$0.003 \pm 0.002$	$0.90 \pm 0.12$
	73.4	210	$0.012 \pm 0.008$	$0.065 \pm 0.117$	$0.006 \pm 0.003$	$0.97 \pm 0.04$
	73.4	250	$0.013 \pm 0.014$	$0.122 \pm 0.097$	$0.003 \pm 0.003$	$0.89 \pm 0.14$
Water	33.4	250	$0.453 \pm 0.010^{****}$	$0.523 \pm 0.019^{****\dagger}$	$0.053 \pm 0.006$	$0.059 \pm 0.004$
	73.4	210	$0.529 \pm 0.005^{****}$	$0.637 \pm 0.019^{****\dagger}$	$0.054 \pm 0.008$	$0.055 \pm 0.007$
	73.4	250	$0.520 \pm 0.012^{****}$	$0.603 \pm 0.020^{****\dagger}$	$0.051 \pm 0.005$	$0.051 \pm 0.004$

<sup>a</sup>Units in the table are ms and  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ . Asterisks indicate significant difference for different TE values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ . Daggers indicate significant difference for different TM values: †  $P < 0.05$ . Statistical differences were evaluated using a one-way ANOVA test followed by *post hoc* analysis.

up to  $b = 49 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (at TE/TM/ $\Delta = 22/111/122 \text{ ms}$ ) in the rat brain, and modeled by biexponential attenuation (20). Our own results are in rather good agreement with values reported in this past study for  $D_{fast}$  ( $\sim 0.2\text{--}0.3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ),  $D_{slow}$  ( $\sim 0.02\text{--}0.04 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ), and  $f_{slow}$  ( $\sim 50\%$ ). It can be noted that SD on estimated parameters, in particular  $f_{slow}$ , seems larger in our study, which we ascribe to the fact that here SD was determined from interindividual measurements and biexponential fits (which are known to be unstable), while in Pfeuffer et al (20), it was estimated by Monte Carlo simulation. We also used lower maximal  $b$ -values, because in the worst condition (long TE/TM experiments), we could not go higher than  $b = 30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .

#### On the Absence of Dependency of Metabolite Diffusion on TE/TM

As far as we know, the dependency of diffusion properties on TM (at constant diffusion time) has never been studied. No dependency was found in the present work, but the range of TM explored here was very limited (compared with metabolite typical T1), because TM variation cannot be larger than  $2\tau$  (see Figure 2), and  $\tau$  cannot be increased much if one wants to preserve high enough SNR on single scans. The possibility of a correlation between TM and T1 thus remains to be better characterized on a larger range of TM.

Three published works report some dependency of metabolite diffusion on TE (10–12). In the excised bovine optic nerve, Assaf and Cohen (11) report a strong effect of TE on tCho, tCr, and NAA diffusion (other metabolites

were not measured), longer TE leading to more restricted apparent diffusion, for the investigated diffusion time  $\Delta$  (95 ms). In the excised rat brain, the same group (10) reports an effect of TE on NAA diffusion (other metabolites were not measured), longer TE leading to larger fraction for the slow diffusing component, and in the meantime to larger  $D_{fast}$  and  $D_{slow}$ . In the human white matter, Branzoli et al (12) measured a complex dependency, with the ADC of NAA and tCr tending to increase with increasing TE for the short  $\Delta$  condition (44 ms) tested, while the ADC of tCr tended to decrease with increasing TE for the long  $\Delta$  condition (246 ms) tested, and no significant change was reported for tCho (other metabolites were not measured).

Methodological differences might partly explain the fact that, unlike here, these former studies detected some dependency on TE. In particular, in the works of Assaf and Cohen, it is not clear if scan-to-scan phasing was performed to correct for bulk translational motion. On the present data, absence of scan-to-scan phasing can lead to an overestimation of signal attenuation by a few tens of percent at high  $b$ , and bias of the same order of magnitude on diffusion parameters, illustrating the critical importance of performing scan-to-scan phasing. If different sequence timings resulted in different gradient and acoustic vibrations in these past works, translational motion may have been different for the different timings and have resulted in some bias, assuming no phase correction was performed. In addition, macromolecule signal was apparently not accounted for, while it can still be significant for TE shorter than 80–100 ms, even at



11.7 T. Finally, in the case of excised tissues, it is possible that homeostasis is not maintained anymore, leading to a “leakage” of metabolites into the extracellular space and a different diffusion-relaxation behavior.

A limitation of the present study is that the range of TE explored is narrower than in past studies, as we did not go to such long TE [up to 160 ms in the human brain (12), 200 ms in the rat brain (10) and 550 ms in the bovine optic nerve (11)]. This was dictated by the necessity to preserve high enough metabolite signal on individual scans to perform scan-to-scan phasing. The range of TE explored here would still be enough to significantly change the relative contribution of potential metabolic pools with “short” T2 [i.e., a few tens of ms, as identified in Assaf and Cohen (10,11)], thus allowing to detect potential different diffusion behavior of these short T2 pools compared with pools with longer T2. In that respect, we think that the narrower TE range is not likely to fully explain the discrepancy between our study and those having explored TE up to 200 ms in vivo (10,12). However, our study would not be very sensitive to detect potential correlation between diffusion and relaxation for the longer T2 pools (more than a few hundreds of ms), as identified in the excised optic nerve at TE = 550 ms (11).

Another potential explanation might be due to the different kinds of fibers investigated. While axons in the optic nerve and human white matter are myelinated, the total myelin content is low in the large voxel of the mouse brain investigated here, which contains a lot of gray matter. We actually evaluated the volume fraction occupied by white matter to be less than 20% in the spectroscopic voxel, based on fractional anisotropy maps that we acquired in some mice. Hence, a potential influence of myelin would be less diluted in (11,12) compared with the present study, possibly explaining a correlation due to myelin between TE and diffusion properties that we did not observe here. The source of such a “myelin effect” may be due to the presence of a metabolite compartment within the myelin sheath, but in that case, we rather expect this compartment to have a short T2 and highly restricted diffusion, which is not consistent with the studies of Assaf and Cohen and with the long  $\Delta$  behavior in Branzoli et al. Another source of correlation might be the surface relaxivity of myelin, yielding an interplay between TE and measured diffusion properties that is certainly more complex, e.g., depending on the dispersity of geometries, but where stronger effects of surface relaxivity (e.g., at longer TE) might lead to an apparently more restricted diffusion (here we quote the words of Codd and Callaghan (25): “ignoring the presence of significant wall relaxation can lead to both an underestimation of the pore dimensions and a misidentification of the pore geometry”).

#### A Few Words on Macromolecules

MM diffusion in the brain has received little attention to date. Pfeuffer et al (20) report an MM attenuation of 3% at  $b = 5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  and  $\text{TE}/\text{TM}/\Delta = 22/111/122 \text{ ms}$ , which is of the same order of magnitude as what we measure here for the different timing combinations. They also report

that MM attenuation is monoexponential up to  $b = 49 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (although no figure displays MM attenuation and no  $R^2$  is given), yielding an ADC of  $0.0063 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , which is slightly lower than the values we report here when fitting in the  $b = 0\text{--}5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  range (ADC  $\sim 0.009\text{--}0.016$  depending on the condition). If we perform a log-linear fit of the MM signal up to  $b = 40$  (at  $\Delta = 254.2 \text{ ms}$ ) or  $60 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (at  $\Delta = 64.2 \text{ ms}$ ) for the “short TE” conditions (i.e., in the best SNR conditions for MM), we find ADC =  $0.0103$  or  $0.0047 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , which is relatively similar to values reported in Pfeuffer et al (20). However, in the present work, we do not find a strictly monoexponential attenuation for MM, although the diffusion attenuation is indeed found to be much “less” biexponential than for metabolites, with a slow-diffusing fraction higher than  $\sim 90\%$  in all conditions.

Although the dependency of MM signal attenuation on TE is not significant according to ANOVA, the fact that the average attenuation is found consistently lower when TE is increased, for almost all  $b$ -values, suggests that a dependency on TE might indeed exist but be masked by measurement noise (type II error). We think this is plausible: one can indeed imagine a continuum of MM molecular weights contributing to MM signal (e.g., see Behar and Ogino) (26) with larger MM being associated with shorter T2 and slower diffusion. However, this remains to be confirmed by additional studies.

## CONCLUSIONS

In this work, using a new sequence (dubbed “STE-LASER”) yielding no cross-terms between selection and diffusion gradients, combined with state-of-the-art post-processing (including scan-to-scan phasing and experimental macromolecule signal quantification) and hardware (cryoprobe at 11.7 T) to minimize bias and maximize SNR, we measured little or no dependency of metabolite diffusion properties on TE/TM in a large voxel of the mouse brain in vivo, in the range of TE/TM values explored. These results are quite different from previous works, which might be due to methodological differences, and also to the different tissue composition of the voxels, in particular the relatively low amount of myelin in the large voxel of the present study. In our opinion, the present work strongly supports the practice of interpreting and modeling metabolite diffusion primarily based on geometry, irrespective of relaxation properties (multicompartmental relaxation or surface relaxivity), at least under the experimental conditions of this study. How to model these data will be the subject of future works. The potential correlation between macromolecule relaxation and diffusion, as well as the possible role of myelin in past studies reporting correlation between metabolites relaxation and diffusion, remain to be explored in deeper details.

## ACKNOWLEDGMENTS

The 11.7 T MRI scanner was funded by a grant from “Investissements d’Avenir - ANR-11-INBS-0011” - NeuroATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences.

## REFERENCES

- Nicolay K, Braun KP, Graaf RA, Dijkhuizen RM, Kruiskamp MJ. Diffusion NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2001;14:94–111.
- Kroenke CD, Ackerman JJ, Yablonskiy DA. On the nature of the NAA diffusion attenuated MR signal in the central nervous system. *Magn Reson Med* 2004;52:1052–1059.
- Marchadour C, Brouillet E, Hantraye P, Lebon V, Valette J. Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:2153–2160.
- Ronen I, Ercan E, Webb A. Axonal and glial microstructural information obtained with diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy at 7T. *Front Integr Neurosci* 2013;7:13.
- Ronen I, Budde M, Ercan E, Annese J, Techawiboonwong A, Webb A. Microstructural organization of axons in the human corpus callosum quantified by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of N-acetylaspartate and post-mortem histology. *Brain Struct Funct* 2014;219:1773–1785.
- Najac C, Marchadour C, Guillemier M, Houitte D, Slavov V, Brouillet E, Hantraye P, Lebon V, Valette J. Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *Neuroimage* 2014;90:374–380.
- Najac C, Branzoli F, Ronen I, Valette J. Brain intracellular metabolites are freely diffusing along cell fibers in grey and white matter, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. *Brain Struct Funct* 2014. DOI: 10.1007/s00429-014-0968-5.
- Mitra PP, Sen PN. Effects of microgeometry and surface relaxation on NMR pulsed-field-gradient experiments: simple pore geometries. *Phys Rev B Condens Matter* 1992;45:143–156.
- Hurlimann MD, Latour LL, Sotak CH. Diffusion measurement in sandstone core: NMR determination of surface-to-volume ratio and surface relaxivity. *Magn Reson Imaging* 1994;12:325–327.
- Assaf Y, Cohen Y. Non-mono-exponential attenuation of water and N-acetyl aspartate signals due to diffusion in brain tissue. *J Magn Reson* 1998;131:69–85.
- Assaf Y, Cohen Y. Structural information in neuronal tissue as revealed by q-space diffusion NMR spectroscopy of metabolites in bovine optic nerve. *NMR Biomed* 1999;12:335–344.
- Branzoli F, Ercan E, Webb A, Ronen I. The interaction between apparent diffusion coefficients and transverse relaxation rates of human brain metabolites and water studied by diffusion-weighted spectroscopy at 7 T. *NMR Biomed* 2014;27:495–506.
- Does MD, Gore JC. Compartmental study of diffusion and relaxation measured in vivo in normal and ischemic rat brain and trigeminal nerve. *Magn Reson Med* 2000;43:837–844.
- Le Bihan D, Joly O, Aso T, Uhrig L, Poupon C, Tani N, Iwamuro H, Urayama SI, Jarraya B. Brain tissue water comes in two pools: evidence from diffusion and R2' measurements with USPIOs in non human primates. *Neuroimage* 2012;62:9–16.
- Shemesh N, Rosenberg JT, Dumez J-N, Muniz JA, Grant SC, Frydman L. Metabolic properties in stroked rats revealed by relaxation-enhanced magnetic resonance spectroscopy at ultrahigh fields. *Nat Commun* 2014;5:4958.
- Garwood M, DelaBarre L. The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR. *J Magn Reson* 2001;153:155–177.
- Valette J, Lethimonnier F, Lebon V. About the origins of NMR diffusion-weighting induced by frequency-swept pulses. *J Magn Reson* 2010;205:255–259.
- Valette J, Giraudeau C, Marchadour C, Djemai B, Geffroy F, Ghaly MA, Le Bihan D, Hantraye P, Lebon V, Lethimonnier F. A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magn Reson Med* 2012;68:1705–1712.
- Kunz N, Cudalbu C, Mlynarik V, Huppi PS, Sizonenko SV, Gruetter R. Diffusion-weighted spectroscopy: a novel approach to determine macromolecule resonances in short-echo time 1H-MRS. *Magn Reson Med* 2010;64:939–946.
- Pfeuffer J, Tkac I, Gruetter R. 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* 2000;20:736–746.
- Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993;30:672–679.
- Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 2000;13:129–153.
- Valette J, Guillemier M, Besret L, Boumezeur F, Hantraye P, Lebon V. Optimized diffusion-weighted spectroscopy for measuring brain glutamate apparent diffusion coefficient on a whole-body MR system. *NMR Biomed* 2005;18:527–533.
- Kan HE, Techawiboonwong A, van Osch MJ, Versluis MJ, Deelchand DK, Henry PG, Marjanska M, van Buchem MA, Webb AG, Ronen I. Differences in apparent diffusion coefficients of brain metabolites between grey and white matter in the human brain measured at 7 T. *Magn Reson Med* 2012;67:1203–1209.
- Codd SL, Callaghan PT. Spin echo analysis of restricted diffusion under generalized gradient waveforms: planar, cylindrical, and spherical pores with wall relaxivity. *J Magn Reson* 1999;137:358–372.
- Behar KL, Ogino T. Characterization of macromolecule resonances in the 1H NMR spectrum of rat brain. *Magn Reson Med* 1993;30:38–44.

# Probing alterations of cellular metabolism and structure in CNTF-induced mouse model of astrocytic activation using in vivo MRS and diffusion-weighted MRS

Clemence Ligneul<sup>1</sup>, Marco Palombo<sup>1</sup>, Edwin Hernandez Gazon<sup>1</sup>, Martine Guillermier<sup>1</sup>, Sueva Bernier<sup>1</sup>, Kelly Ceyzeriat<sup>1</sup>, Laurene Abjean<sup>1</sup>, Julien Flament<sup>1,2</sup>, Carole Escartin<sup>1</sup>, and Julien Valette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Fontenay aux Roses, France, <sup>2</sup>UMS 27, INSERM, Fontenay aux Roses, France

## Synopsis

In this work we use in vivo MRS and diffusion-weighted MRS (DW MRS) on a model of astrocytic activation induced by the ciliary neurotrophic factor (CNTF) in mice striatum. We observe a massive metabolic remodeling in CNTF mice in comparison with control mice. We demonstrate the intrinsic potential of DW MRS to detect alterations in cellular structure by measuring substantial variations in diffusion properties of astrocytic and neuronal metabolites. Modeling suggests significantly larger astrocytic processes, consistently with astrocytic hypertrophy as observed by microscopy in the context of activation.

## Purpose

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is known to be a neuroprotective agent and an activator of astrocytes. We use in vivo MRS and diffusion weighted MRS (DW-MRS) at various diffusion-weightings and diffusion times to detect alterations of cellular metabolic content and structure in mice overexpressing CNTF in the striatum. We report massive metabolic remodeling, as well as important changes in metabolites diffusion properties that we relate to structural modifications, in particular astrocytic hypertrophy associated with activation.

## Methods

Ten C57Bl/6 mice (8-week old) were co-injected bilaterally in the striatum with lentiviral vectors encoding GFP targeting astrocytes and with lentiviral vectors targeting neurons encoding either the human CNTF gene (5 animals) or the beta-galactosidase (LacZ) gene for control (5 animals). Mice were scanned using an 11.7 T Bruker scanner equipped with a cryoprobe. MRS and DW-MRS were acquired using our STE-LASER sequence<sup>1</sup>. A 56-mm<sup>3</sup> voxel was positioned around the striatum (Fig.1A). Spectra were acquired at diffusion time  $t_d=53$  ms up to very high  $b$  (50 ms/ $\mu\text{m}^2$ ) to be sensitive to short-range structure such as fiber radius<sup>2</sup>; and at longer  $t_d$  (from 103 to 2003 ms, at  $b=0$  and 3 ms/ $\mu\text{m}^2$ ) to be sensitive to the long-range cellular structure<sup>3</sup>. Post-processing was performed as in<sup>1</sup>. Macromolecule spectra were acquired for each phenotype and included in the LCModel basis set. Metabolite concentrations were determined relative to tCr.

## Results

**Metabolic alterations:** Typical spectra are shown in Fig.1B-C, illustrating the striking metabolic remodeling. Significant decrease was observed for NAA (-33%) and glutamate (Glu) (-23%), and significant increase for Ins (+190%), choline compounds (+18%) and lactate (Lac) (+100%), which is consistent with a prior study on rats<sup>4</sup>. Interestingly macromolecule spectra are quite different between both types of mice, especially around 1.2 ppm. This might partly result from the larger amount of membranes required for hypertrophic astrocytes, particularly cholesterol.

**Alterations of short-range structure:** Signal attenuation as a function of  $b$  is stronger for Ins and tCho, usually considered as astrocytic metabolites, in CNTF mice (Fig.2). Modeling these data with an infinite cylinder model<sup>2</sup> results in increased fiber radius for most metabolites, except for NAA and Glu which yield reduced radii (Fig.3). Free intracellular diffusion coefficient  $D_{\text{intra}}$  was estimated to be stable except for NAA (decrease from  $0.38\pm 0.04$  to  $0.34\pm 0.03$   $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ,  $p=0.02$ ).

**Alterations of long-range structure:** The apparent diffusion coefficient (ADC) as a function of  $t_d$  is generally quite similar between both groups, for most metabolites. Only Ins sets apart, with substantially higher ADC at longer  $t_d$  in CNTF mice (Fig.4). This difference suggests that Ins is diffusing in longer processes in CNTF mice. Modeling these data using the approach introduced in<sup>3</sup> indeed yields more embranchments (from  $N=4\pm 3$  to  $N=5\pm 3$ ) and longer segments (from  $L=12\pm 8$  to  $L=33\pm 8$   $\mu\text{m}$ ).

## Discussion

Astrocytic activation is associated with astrocytic hypertrophy, although it is not always clear in the literature what is really changing (larger or longer fibers, alterations in complexity...). Increased estimated radius for some metabolites, in particular for Ins (+50%) as well as for tCho (+31%), which are thought to be astrocytic, is consistent with an increased radius of astrocytic processes. Interestingly, preliminary histological study of GFP-transduced astrocytes in one mouse of each phenotype (22 cells in each animal) using confocal microscopy (Fig.5) yielded a ~10% increased radius in CNTF mice (from  $0.41\pm 0.07$  to  $0.45\pm 0.08$   $\mu\text{m}$ ). It should be noted that, in terms of absolute values, modeling yields larger radii than microscopy. This overestimation might partly arise from small secondary structures (leaflets) leading to increased radial diffusivity, and from cell bodies, which might demand refined models. The decreased estimated radius for NAA and Glu, which are typically associated with neurons, suggests that axonal and dendritic radius may be reduced during activation.

Regarding alterations of long-range structure, preliminary analysis of confocal microscopy data indeed suggests the presence of some longer astrocytic processes. However it is unclear why only Ins (but not tCho) would be sensitive to these variations. It is conceivable that Ins and tCho are in different glial populations.

## Conclusion

In this model of astrocytic activation, diffusion-weighted MRS revealed structural alterations, suggesting hypertrophic astrocytes (larger and longer fibers) and atrophied neurons (smaller fiber diameter). Beyond demonstrating the intrinsic potential of the method to monitor astrocytic activation, this work also casts some new light on the alteration of the biochemical profile during activation: the apparent variations in metabolic concentrations may rather be associated with variations in compartment volumes than with changes of local cytosolic concentrations, bigger compartments for tCho and Ins resulting in increased apparent concentrations, and smaller compartments for NAA and Glu resulting in decreased apparent concentrations.

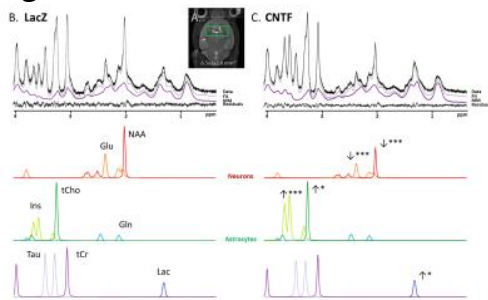
## Acknowledgements

This work was funded by the European Research Council (grant #336331).

## References

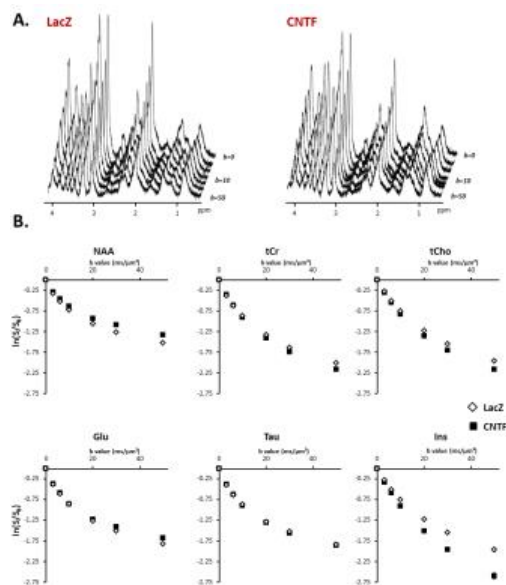
- <sup>1</sup> Ligneul et al. Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain *in vivo*: revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. MRM 2016; doi: 10.1002/mrm.26217
- <sup>2</sup> Palombo et al. Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high diffusion-weighting: diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation. MRM 2016; doi: 10.1002/mrm.26548
- <sup>3</sup> Palombo et al. A new paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy *in vivo*. PNAS 2016; pii: 201504327
- <sup>4</sup> Carillo-de Sauvage et al. The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an *in vivo* multimodal magnetic resonance imaging study. JCBFM 2015; 35(6):917-2

## Figures



**Figure 1:**

The voxel (green rectangle) is located around the mouse striatum (A). Representative *in vivo* 1H-MRS spectra in LacZ mouse (B) and CNTF mouse (C) acquired at  $TM=50$  ms (without diffusion-weighting). Spectral decomposition proposed by LCModel is shown for metabolites with  $CRLB < 5\%$ . Statistical significance (t-test): \*\*\*p-value<0.001, \*\*p-value<0.01, \*p-value<0.05.

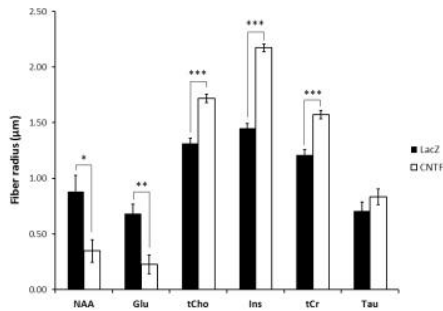


**Figure 2:**

A. Typical stack plot of spectra acquired for each group. Each stack plot is acquired in a single experimental session.

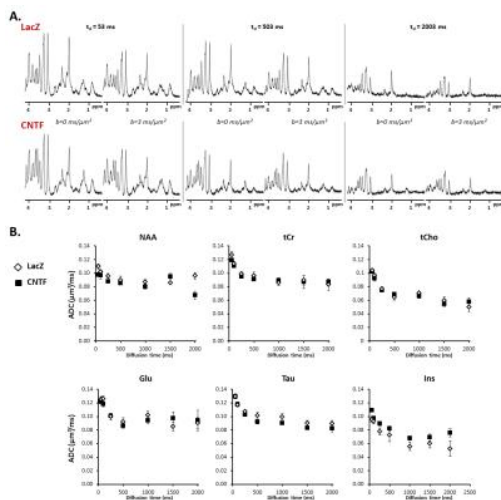
B. Logarithm of signal attenuation as a function of the diffusion-weighting b, averaged over the five mice of each group (each mice being scanned twice) for the six main metabolites. Error bars stand for standard errors of the mean (barely visible as they are very small).





**Figure 3:**

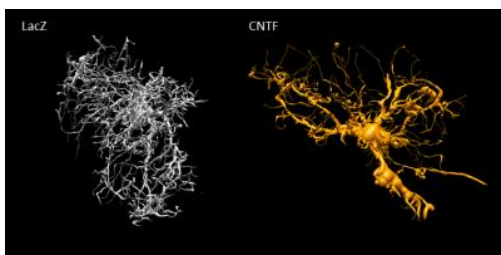
Radii extracted from infinite cylinder neurite modeling applied on averaged logarithm signal attenuation as a function of  $b$  (**Fig.2**) for the six main metabolites. Statistical significance: \*\*\* $p$ -value<0.001, \*\* $p$ -value<0.01, \* $p$ -value<0.05. For the modeling,  $p$ -values were obtained from permutation test on the Monte Carlo distributions.



**Figure 4:**

A. Typical spectra acquired at different diffusion times for each group.

B. Apparent diffusion coefficient as a function of diffusion time, averaged over the five mice of each group (each mouse being scanned twice) for the six main metabolites. Error bars stand for standard errors of the mean.



**Figure 5:**

Representative astrocytes reconstructed from confocal laser scanning microscopy of the GFP-expressing astrocytes in the striatal area of the mice injected with lentivirus for neuronal expression of CNTF or LacZ as control. An increase in the diameter and length of the main processes is visible in the context of CNTF-activated astrocytes.

## RESEARCH ARTICLE

# Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and “short”-echo-time diffusion-weighted MRS

Clémence Ligneul<sup>1,2</sup> | Julien Valette<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRCen, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

**Correspondence**

J. Valette, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.  
Email: julien.valette@cea.fr

**Funding information**

European Research Council, Grant/Award Number: 336331.

**Abstract**

Measuring diffusion at ultra-short time scales may yield information about short-range intracellular structure and cytosol viscosity. However, reaching such time scales usually requires oscillating gradients, which in turn imply long echo times  $T_E$ . Here we propose a new kind of stretched oscillating gradient that allows us to increase diffusion-weighting  $b$  while preserving spectral and temporal properties of the gradient modulation. We used these optimized gradients to measure metabolite diffusion in the mouse brain down to effective diffusion times of 1 ms while keeping  $T_E$  relatively short (60 ms). At such  $T_E$ , a significant macromolecule signal could still be observed and used as an internal reference of approximately null diffusivity, which proved critical to discard datasets corrupted by some motion artifact. The methods introduced here may be useful to improve the accuracy and precision of metabolite apparent diffusion coefficient measurements with oscillating gradients.

**KEYWORDS**

brain, diffusion, macromolecule, metabolite, motion artifact, MRS, oscillating gradient

## 1 | INTRODUCTION

Diffusion-weighted MRS (DW-MRS) has the enormous potential to non-invasively probe intracellular space organization, due to the cell-specific compartmentation of most metabolites (for review see References 1–3). The apparent diffusion coefficient (ADC) that can be quantified for metabolites is related to their quadratic displacement during the diffusion time  $t_d$ . Thus, DW-MRS is potentially sensitive to any phenomenon affecting the quadratic displacement during  $t_d$ , including viscosity, subcellular compartmentation, presence of organelles, and cell shape and size. Up to now, most works have been performed in a relatively narrow range of diffusion times (from 11.7 ms (Reference 4) to 242 ms (Reference 5)). In recent years, we have engaged in the exploration of metabolite diffusion over unprecedented

times scales, from very short times ( $\sim 1$  ms) in the rat brain<sup>6</sup> to very long times ( $\sim 1$ –2 s) in the mouse,<sup>7</sup> primate,<sup>7,8</sup> and human brain,<sup>9</sup> in order to probe the intracellular environment at various spatial scales. From these studies, the following pattern has emerged: as  $t_d$  is increased, metabolite ADC quickly decreases at short times, while it then tends to plateau at longer times (although with a very slight tendency to keep decreasing). Taken together, these data suggest that metabolites are encountering numerous new obstacles at short time scales (e.g. organelles or membranes of cellular processes), while they are then relatively free to diffuse along the direction of cellular process (i.e., they barely encounter new kinds of hindering structure as they diffuse along fibers). In our opinion, this illustrates the potential of studying metabolite diffusion at unconventional diffusion times.

One of the limitation of our work in the rat brain<sup>6</sup> at very short  $t_d$ , or more precisely at very high frequencies as oscillating gradients were used, was the relatively low signal-to-noise ratio (SNR) in the spectra due to the long echo times ( $T_E = 154$  ms), largely imposed by the necessity to use long oscillating gradients with several successive dephasing-rephasing periods to reach sufficient diffusion-weighting. Low SNR resulted in large standard deviation on ADC, and the use of

**Abbreviations:** ADC, apparent diffusion coefficient; CRLB, Cramér-Rao lower bound; DW-MRS, diffusion-weighted MRS; Ins, myo-inositol; LASER, localization by adiabatic selective refocusing; MM, macromolecule; NAA, N-acetyl aspartate; PFG, pulsed field gradient; SNR, signal-to-noise ratio; Tau, taurine; tCho, choline compounds; tCr, total creatine;  $t_d$ , diffusion time;  $T_E$ , echo time

long  $T_E$  also reduced the set of observable metabolites to the most prominent singlet peaks (N-acetyl aspartate, NAA, total creatine, tCr, and choline compounds, tCho). The goal of the present work is to revisit metabolite diffusion at very short time scales, by proposing a short- $T_E$  strategy allowing the observation of a larger number of metabolites, with a better precision. First, from the apodized cosine originally proposed in Reference 10, we derive a new class of oscillating gradient, by stretching the cosine's lobes to maximize diffusion-weighting for a given period and gradient duration, while well preserving the gradient modulation spectrum. Using these gradients, we then perform DW-MRS experiments at  $T_E = 60$  ms in the mouse brain at 11.7 T. One unexpected result is that some intermittent motion artifact seems to occur at some particular frequencies, as evidenced when quantifying macromolecule (MM) signal, which can be considered as an internal reference of almost null diffusivity. We propose to use MM signal as a quality control to retrospectively discard spectra corrupted by this motion artifact. In the end, we are able to measure ADC for NAA, tCr, tCho, myo-inositol (Ins) and taurine (Tau) for frequencies ranging from 35 Hz to 252 Hz (corresponding to effective  $t_d$  ranging from 0.99 ms to 7.1 ms) in the mouse brain.

## 2 | THEORY

### 2.1 | Oscillating gradients

Oscillating gradients have been used to probe water diffusion at short time scales *in vitro* or *in vivo*. The maximal gradient strength constitutes an important hardware limitation to maintain a good diffusion contrast at very short diffusion times/high frequencies. Since water diffuses quite fast ( $D_{\text{free}} \sim 2 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  at 20°C), very high frequencies have already been reached with sufficient diffusion contrast *in vitro* or *in vivo* even at low  $b$  values, around  $b_{\text{max}} = 0.4 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .<sup>10-12</sup> In contrast, metabolites diffuse much more slowly than water, so achieving good diffusion contrast requires higher  $b$  values. Diffusion-weighted spectroscopy at very high frequencies is therefore a methodological challenge in terms of signal and diffusion contrast, and appeals for solutions to increase the maximal reachable  $b$  value within given maximal gradient strength.

The most optimized existing oscillating gradient shape in terms of frequency selection is the apodized cosine gradient, defined in Reference 10 as a sine-edged cosine-modulated gradient, that we used in a previous DW-MRS work.<sup>6</sup> To increase  $b_{\text{max}}$  we propose to stretch the lobes of this gradient shape. This can be achieved by introducing a stretching exponent  $\alpha$ , resulting in an increased area under each lobe, as detailed in the following gradient waveform equation:

$$G_{\text{max}} \cos\left(\frac{\pi}{2} \left(\frac{8Nt}{T_g} - 1\right)^\alpha\right) \text{ for } 0 \leq t < \frac{T_g}{4N}$$

$$G(t) = (-1)^{k+1} G_{\text{max}} \cos\left(\frac{\pi}{2} \left(2\left(\frac{4Nt}{T_g} - k\right) - 1\right)^\alpha\right) \text{ for } \frac{T_g}{4N} \leq t < T_g - \frac{T_g}{4N}, k = E\left(\frac{4Nt}{T_g}\right)$$
(1)

$$G_{\text{max}} \cos\left(\frac{\pi}{2} \left(\frac{8Nt}{T_g} - 8N + 1\right)^\alpha\right) \text{ for } T_g - \frac{T_g}{4N} \leq t < T_g.$$

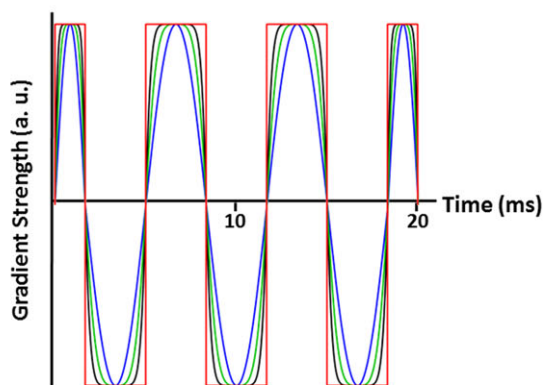
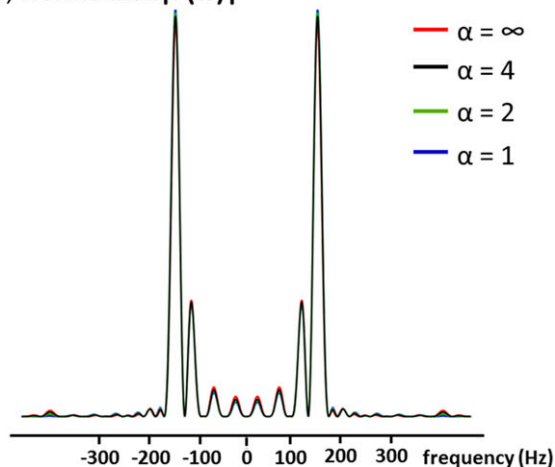
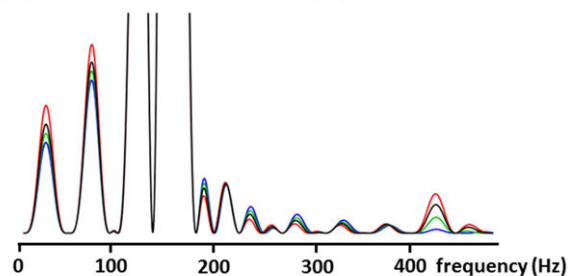
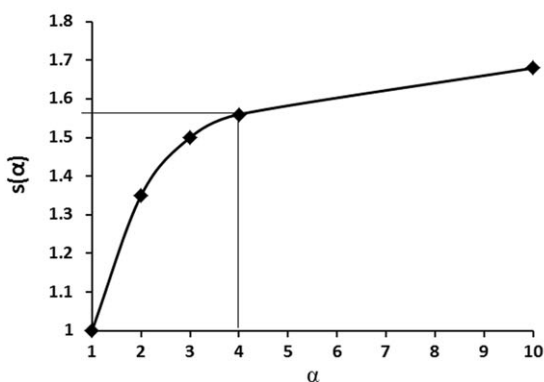
$N$  is the number of periods,  $T_g$  is the total duration of the gradient waveform,  $G_{\text{max}}$  is the amplitude of the gradient and  $\alpha$  is the stretching exponent.  $\alpha = 1$  corresponds to the usual apodized cosine gradient introduced in Reference 10. Note that the stretched cosine gradient tends to an oscillating crenel when  $\alpha$  tends to infinity (which would be equivalent to the "trapezoid-cosine" waveform<sup>13</sup> with infinitely short rise time).

With oscillating gradients, the best approach to describe diffusion-weighting is to work in the frequency domain, as originally proposed by Stepisnik and Callaghan,<sup>14,15</sup> by considering two important objects: the diffusion spectrum  $D(\omega)$  (which is the Fourier transform of particles' velocity autocorrelation function along the gradient direction), and the gradient modulation spectrum  $F(\omega)$  (the Fourier transform of the time integral of gradient waveform  $G(t)$ ). This allows evaluation of signal attenuation  $S/S_0$ ,<sup>10</sup>

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\frac{1}{\pi} \int_0^\infty |F(\omega)|^2 D(\omega) d\omega. \quad (2)$$

Long oscillating gradients yield  $F(\omega)$  characterized by narrow peaks, allowing clean probing of  $D(\omega)$  at different frequencies. Gradient waveform and spectrum  $|F(\omega)|^2$  for  $\alpha = 2, 4$  and  $\infty$  (numerically calculated) are represented in Figure 1A,B, and compared with those for  $\alpha = 1$ , for a gradient duration of 20 ms and  $N = 3$ . Note that, in Figure 1B, the  $|F(\omega)|^2$  functions were normalized (i.e. divided by their integral) to facilitate comparison. The calculation of the gradient modulation spectrum was actually done for two 20 ms gradient waveforms surrounding a 2 ms refocusing RF pulse, as in a realistic sequence (see Methods). The gradient modulation spectra are extremely similar, in terms of the positions of the main and secondary peaks, for the usual and stretched cosine gradients. Hence we can safely assume that the frequency selections are identical in good approximation. The reader can refer to the appendix to be convinced that this approximation is still relevant even in the worst case scenario (oscillating crenel, i.e.  $\alpha = \infty$ ). Because  $\alpha$  does not strongly affect the selection properties of the waveform, we will use the same relationship as given in Reference 11 between the number of periods (or the frequency) and the effective diffusion time for an apodized cosine:  $t_d = \frac{1}{4\omega}$ . Now, whatever the value of  $\alpha$ , some secondary lobes appear on the gradient modulation spectra, due to the relatively low  $N$  examined here (and used below) and the presence of a 2 ms gap between the two waveforms, which degrade the perfect frequency selection ideally achieved at  $\omega = N/T_g$ . This can be visualized in Figure 1C, which is a zoom around the main peak, showing the secondary lobes (for different  $\alpha$ ). Although this is far from capturing all the information conveyed in the gradient modulation spectrum, we propose to compute an effective sampled frequency using a weighted-average frequency, to account for the influence of all lobes in the actual gradient modulation spectrum:

$$\omega_{\text{eff}} = \frac{\int_0^\infty \omega |F(\omega)|^2 d\omega}{\int_0^\infty |F(\omega)|^2 d\omega}. \quad (3)$$

**(A) Gradient shape****(B) Normalized  $|F(\omega)|^2$** **(C) Zoom on normalized  $|F(\omega)|^2$** **(D) Gain in  $b$** 

**FIGURE 1** Comparison of stretched cosine waveforms for  $\alpha = 1$  (usual apodized cosine), 2, 4 and infinity. A, Gradient waveforms. B, Corresponding squares of gradient modulation spectra,  $|F(\omega)|^2$ , normalized by their integral to facilitate comparison. C, Zoom on  $|F(\omega)|^2$  to visualize secondary lobes. D, Gain in  $b$  value as a function of  $\alpha$  for a given maximal gradient strength

**2.2 | Gain in  $b$** 

The integral of  $|F|^2$  (or equivalently of  $k^2$  according to Parseval's theorem), i.e.  $b$ , is increasing with  $\alpha$ . We numerically quantified the gain in  $b$  as a function of  $\alpha$ ,  $s(\alpha)$ , represented in Figure 1D. The increase is important for low  $\alpha$  values (gain of 1.56 for  $\alpha = 4$  compared with  $\alpha = 1$ ), but then tends to become marginal for higher  $\alpha$  (gain from 1.56 to 1.72 for  $\alpha = 4$  to  $\alpha = \infty$ ).

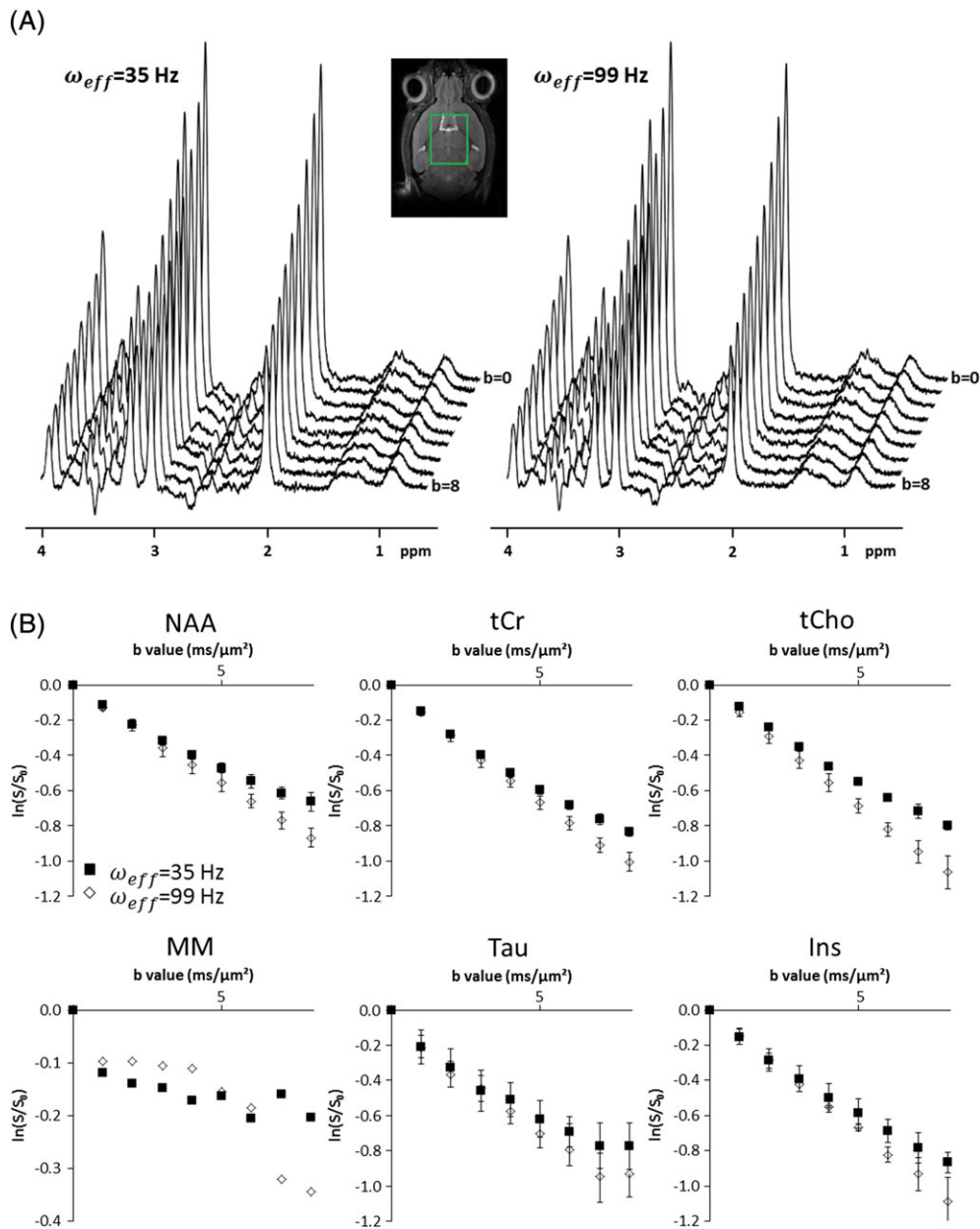
**3 | METHODS****3.1 | Experimental setup**

Stretched oscillating gradients were implemented within a diffusion-weighted asymmetric LASER (localization by adiabatic selective refocusing) sequence as described in Reference 6, on a horizontal 11.7 T Bruker (Ettlingen, Germany) scanner running with ParaVision 6.0. The maximal gradient strength is  $G_{\max} = 752$  mT/m on each axis, with 100  $\mu$ s rise time. A quadrature surface cryogenic antenna was used for experiments in the mouse brain. The hyperbolic secant pulses used for refocusing in LASER had a 2 ms duration (corresponding to 10 kHz bandwidth).

To maximize metabolite and MM signal,  $T_E$  was chosen to be relatively short ( $T_E = 60$  ms) with a gradient duration  $T_g$  of 20 ms for each waveform (i.e. a total diffusion gradient duration of 40 ms, considering the two waveforms positioned symmetrically around the first refocusing pulse). Repetition time was set to 3000 ms. Water suppression was achieved with a VAPOR module. Diffusion-weighting was applied on all three axes simultaneously, using a stretching factor  $\alpha = 4$ . We considered this a reasonable compromise between achieving a significant increase in diffusion-weighting while remaining below maximal gradient ramp. In a first set of experiments, metabolite signal was acquired at "low" frequencies ( $\omega_{\text{eff}} \approx 35$  Hz and  $\omega_{\text{eff}} \approx 99$  Hz, corresponding to  $N = 1$  and 2 periods) and "high"  $b$  (up to  $b = 8$  ms/ $\mu\text{m}^2$  with 1 ms/ $\mu\text{m}^2$  step). In a second set of experiments, signal was acquired at low  $b$  (0 and 1.2 ms/ $\mu\text{m}^2$ ) but going to higher frequencies ( $\omega_{\text{eff}} = 35, 99, 150, 201$  and 252 Hz, corresponding to  $N$  from 1 to 5). The maximum gradient slew rate actually reached using the stretched gradients (at  $N = 5$  during the first and last half lobes, which are the most constraining) was actually close to the maximal slew rate achievable. Note that it corresponds to a magnetic field variation of 120 T/s (considering all three axes) achieved during about 1 ms at 5 cm from the isocenter, i.e. at the position of the hind legs. For comparison, the field variation can be estimated to be 130 T/s (considering all three axes) during about 1 ms at 1.5 m from the isocenter in the work of Van et al.,<sup>13</sup> which was low enough to avoid peripheral nerve stimulation when using oscillating gradients in humans. Hence it is unlikely that peripheral nerve stimulation occurred in our experiments. Each acquisition consisted in 64 scans stored individually. Voxel dimension was  $6 \times 2.4 \times 5$  mm<sup>3</sup> (see inset in Figure 2).

**3.2 | Phantom validation**

To assess the validity of this new gradient shape, in particular regarding the  $b$  value, experiments were performed on a water phantom at 20°C



**FIGURE 2** A, Typical stack plots acquired at  $\omega_{eff} = 35$  Hz and  $\omega_{eff} = 99$  Hz in a single experimental session. All spectra were acquired in a large  $6 \times 2.4 \times 5$  mm<sup>3</sup> voxel in the mouse brain. No line broadening was applied. B, Logarithm of signal attenuation for each metabolite and the MMs at two different frequencies ( $\omega_{eff} = 35$  Hz and  $\omega_{eff} = 99$  Hz). Error bars stand for the standard deviation determined on four mice. Error bars for MMs are too large to be represented

using  $\alpha = 4$  for the five frequencies and experimental conditions we used *in vivo*. Spectra have a normal aspect, without detectable eddy currents. Signal attenuation has a perfect mono-exponential behavior up to  $b = 1.2$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>, yielding  $D_{water} = 2.16 \pm 0.02$   $\mu$ m<sup>2</sup>/ms, in good agreement with literature. Note that we found exactly the same values using a standard apodized cosine.

### 3.3 | Animals

Experiments were performed on five male C57BL/6 mice (body weight  $\sim 28$ – $30$  g). The protocol was approved by the local ethical committee of the Commissariat à l'Énergie Atomique (French Atomic Energy Commission). All animal experimental procedures were

performed in accordance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for care and use of laboratory animals, and conformed to the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests. Mice were anesthetized with 1.2–1.5% isoflurane in a 1:1 mixture of air and dioxygen (1 L/min). Animals were placed on a stereotaxic bed with a bit and two ear bars to prevent head motion. Mouse temperature was monitored with an endorectal probe and maintained at 37°C with regulated water flow, and respiratory rate was continuously monitored using PC SAM software (Small Animal Instruments, Stony Brook, NY, USA) during scanning. Thirty experiments were performed. For most experiments all frequencies could be acquired; however, for a few experiments the acquisition had to be stopped before the end, so spectra for some frequencies were



actually acquired less than 30 times. The number of measurements for each frequency is given in Table 1. At the end of the experiment, animals were placed on a heating pad and kept under observation until they were fully awake.

### 3.4 | Data analysis

Scan-to-scan phase correction was performed before summing individual scans of each acquisition on MATLAB. Spectra were analyzed with LCMoDel,<sup>16</sup> using a basis set generated with home-made routines based on density matrix formalism. An MM spectrum was acquired using the metabolite nulling technique combined with diffusion-weighting ( $T_1 = 780$  ms,  $b = 10$  ms/ $\mu\text{m}^2$  at  $\omega_{\text{eff}} = 35$  Hz) to yield cleaner metabolite cancellation. Residual metabolite signals coming from resonances with shorter  $T_1$  relaxation were reduced through Hankel-Lanczos singular value decomposition as in Reference 17. The resulting spectrum was included in the LCMoDel basis set. Signal could be reliably quantified (Cramér-Rao lower bounds, CRLB <5%) for NAA, tCr, tCho, Ins and Tau. Glutamate was not properly quantified at this specific  $T_E$ . ADC was evaluated by log-linear regression for the “high- $b$ ” experiments where several  $b$  values were available, or otherwise with the simple formula  $\text{ADC} = -\frac{1}{b} \ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$ .

## 4 | RESULTS

### 4.1 | Data quality

All spectra were acquired with a cryogenic antenna at 11.7 T, yielding good SNR (~170 on NAA, without diffusion-weighting) and good quantification precision. Indeed, total NAA and tCr were quantified on LCMoDel with CRLBs of 0% or 1%. tCho, Tau and Ins were evaluated at about 1 or 2% CRLB. No eddy current could be detected. We actually checked that eddy current correction as we usually perform in post processing had no impact on spectral quality, quantification or ADC at all frequencies, and was therefore not necessary.

### 4.2 | Signal attenuation at high diffusion-weighting

Figure 2A presents stack plots for spectra at different diffusion-weightings, at 35 Hz and 99 Hz. Signal attenuation as quantified for NAA, tCr, tCho, Ins and Tau is shown in Figure 2B. Metabolite signal attenuation is clearly dependent on the chosen frequency, especially at higher  $b$  values. Signal attenuation appears relatively close to mono-exponential in this range of  $b$  values ( $R^2 > 0.98$  at  $\omega_{\text{eff}} = 35$  Hz

**TABLE 1** Number of scans acquired at each frequency (see Methods), and number of scans rejected based on MM signal attenuation (see Results and Discussion)

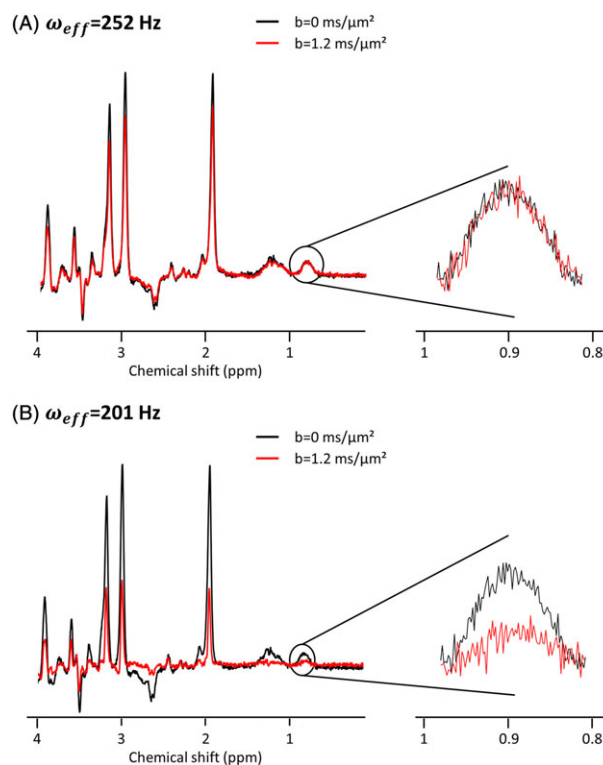
Frequency $\omega_{\text{eff}}$ (in Hz)	Number of acquired scans	Number of rejected scans
35	29	0
99	29	1
150	30	21
201	27	15
252	30	15

and  $R^2 > 0.99$  at  $\omega_{\text{eff}} = 99$  Hz for all metabolites, except for Tau, which seems noisier, especially at the highest  $b$ ). Log-linear fit of metabolite signal gives the following ADC at  $\omega_{\text{eff}} = 35$  Hz and  $\omega_{\text{eff}} = 99$  Hz, respectively: 0.083 and 0.108  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  for NAA; 0.103 and 0.125  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  for tCr; 0.100 and 0.133  $\mu\text{m}^2/\text{m}$  for tCho; 0.106 and 0.117  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  for Tau; 0.106 and 0.134  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  for Ins.

The MM signal attenuation appears to be scattered. To obtain an estimate of the ADC, a linear fit was done between  $b = 0$  and  $b = 5$  ms/ $\mu\text{m}^2$ , yielding ADC = 0.028  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  at  $\omega_{\text{eff}} = 35$  Hz and ADC = 0.024  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  at  $\omega_{\text{eff}} = 99$  Hz. ADC at both frequencies are quite close to MM ADC as measured in the mouse brain in a recent study<sup>18</sup> ( $0.016 \pm 0.005$   $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  at  $t_d = 63$  ms, as determined by a linear fit between  $b = 0$  and  $b = 5$  ms/ $\mu\text{m}^2$ ). The value is slightly higher than that measured in the rat brain (ADC = 0.006  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ),<sup>17</sup> but in that paper the authors did a linear fit up to high  $b$  values (50 ms/ $\mu\text{m}^2$ ), which might lead to ADC underevaluation.

### 4.3 | Signal attenuation at high frequency, and possibility of using MMs as an internal reference

For experiments at high frequency (>100 Hz), we noticed that metabolite signal attenuation was sometimes much stronger than usual (Figure 3), resulting in very high ADC. This phenomenon pointed towards some motion artifact resulting in artifactual signal loss (note that we were never able to observe this artifactual attenuation on phantoms). However, standard deviation of individual scan phase,



**FIGURE 3** Spectra acquired during the same experimental session from the same dataset, at  $b = 0$  and at  $b = 1.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$  and at two different diffusion frequencies (the spectrum at  $b = 0$  ms/ $\mu\text{m}^2$  is the same). A, Spectrum with a normal signal MM attenuation (satisfactory MM factor,  $M = 0.98$ ). B, Spectrum with a very strong MM signal attenuation ( $M = 0.40$ )

which is a marker of translational motion, was not higher than usual ( $\approx 10^\circ$ ) for these experiments. Hence it was not possible to discard corrupted data using an objective criterion based on phase standard deviation. Ideally, we would need an internal standard of known diffusivity that would allow us to retrospectively discard datasets where signal attenuation for this internal standard is stronger than expected. Unfortunately, water cannot be used for this purpose, because its ADC depends on the tissue composition and on the diffusion time *in vivo*.

In contrast, MMs are large molecules with very low diffusion coefficient, as shown earlier. When using a moderate  $b$  such as used in the present study, we expect their signal to remain almost constant. MM signal exhibiting stronger attenuation than expected can be considered as an objective criterion to detect motion artifact and to discard data. The isolated MM peak at 0.9 ppm is still visible at  $T_E = 60$  ms, and is the only one that does not overlap with metabolites, making it suitable to reliably quantify MM signal attenuation. Let us introduce the factor  $M$  to quantify this attenuation. It is defined as the ratio between the MM signal on diffusion-weighted spectra ( $S_{DW}$ ) and on the spectrum at  $b = 0$  ms/ $\mu\text{m}^2$  ( $S_0$ ) for each data set, integrated over the 0.8–1.0 ppm region, spectra being pre-processed to have the same phase and frequency (as determined on metabolite signal) and the same vertical offset (whose value is determined by signal averaging just around the MM peak, i.e. from 0.77 to 0.8 ppm and from 1 to 1.03 ppm):

$$M = \frac{\int_{0.8}^{1.0} S_{DW} dppm}{\int_{0.8}^{1.0} S_0 dppm}. \quad (4)$$

In the above section about signal attenuation at high  $b$ , MM ADC appeared fairly stable at 35 and 99 Hz with an average value of  $0.026 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , and in the following we will assume that this remains the case at higher frequencies, which is the most conservative assumption to avoid selection of datasets biased by motion artifact. To obtain a proper estimation of the expected MM signal attenuation at  $b_{\text{max}} = 1.2$  ms/ $\mu\text{m}^2$  we calculated the attenuation from  $\text{ADC}_{\text{MM}} = 0.026 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , giving  $M_{\text{expected}} = \frac{S}{S_0} = \exp(-0.026 \times 1.2) = 0.97$ . Sometimes  $M$  is slightly larger than unity, which corresponds to measurement noise. We propose to retrospectively evaluate the noise by taking the difference between  $M_{\text{expected}}$  and the maximal  $M$  over all

acquired spectra in all datasets, which is found to be 1.03, corresponding to a noise of 0.06 (1.03 minus 0.97). In the end, we decide to only retain datasets for which  $M$  is comprised in  $M_{\text{expected}} \pm \text{noise}$ , corresponding to  $M$  in the 0.91–1.03 range.

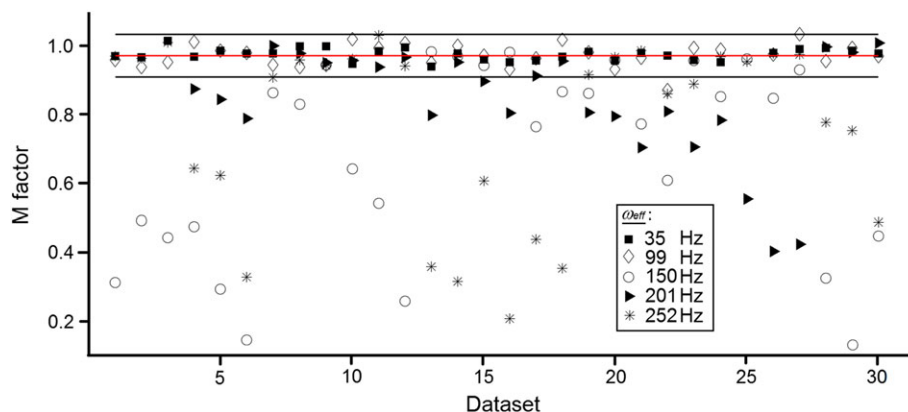
As can be seen in Figure 4, many acquisitions at high frequencies fell outside the  $M_{\text{expected}} \pm \text{noise}$  window, and were consequently discarded. More specifically, rejection rate was 0% at 35 Hz and 3% (1/29) at 99 Hz, but for other frequencies rejection rate was very high (70% at 150 Hz, 56% at 201 Hz and 50% at 252 Hz) (see Table 1).

In Figure 5, ADCs for the five metabolites (NAA, tCr, tCho, Ins and Tau) are displayed as a function of the diffusion frequency, after dataset sorting. Error bars are larger at high frequencies and especially at  $\omega_{\text{eff}} = 150$  Hz and  $\omega_{\text{eff}} = 201$  Hz, which is mainly due to the corresponding high rejection rate and consequently the smaller number of valid acquisitions. ADCs at 35 Hz and 99 Hz appear higher than in the previous section when they were determined by log-linear regression up to  $b = 8$  ms/ $\mu\text{m}^2$ , simply because attenuation is not strictly mono-exponential, so going to higher  $b$  leads to ADC underestimation. Overall, these data point towards a general tendency of ADC to increase with frequency, consistent with less and less hindered diffusion, and metabolites approaching free diffusion. Since ADC values for metabolites *in vivo* at 252 Hz are about one-third of their free diffusion coefficients, cytosol viscosity can be estimated to be less than three times pure water viscosity.

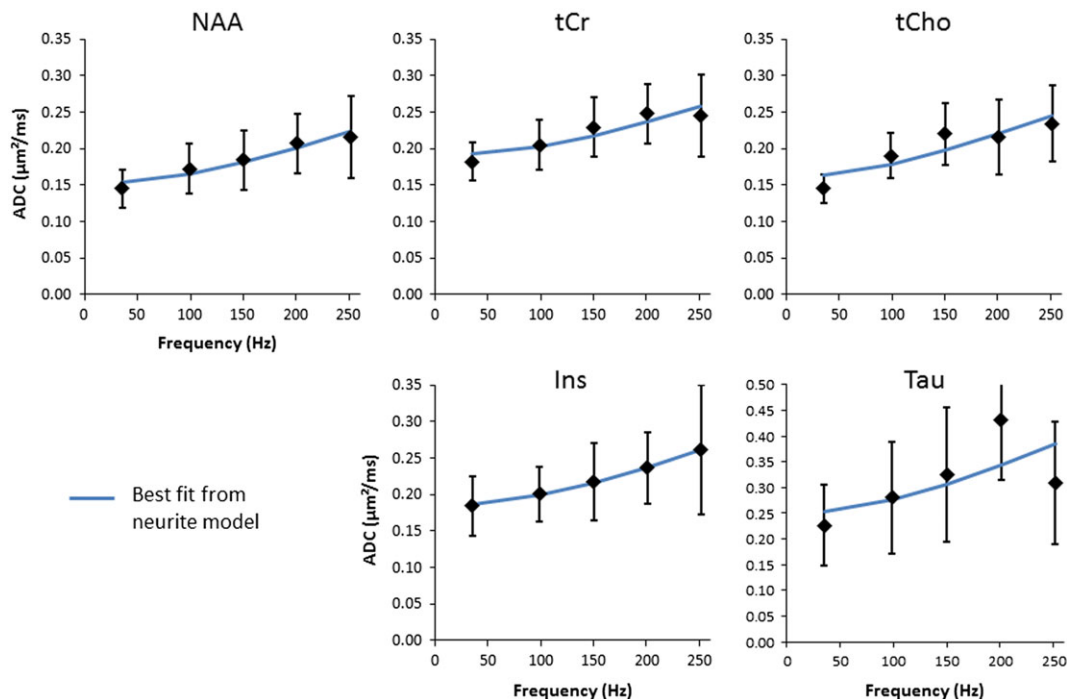
## 5 | DISCUSSION

### 5.1 | Interest of stretched gradients

The stretched cosines as introduced here constitute a class of oscillating waveforms connecting two previously used waveforms. The  $\alpha = 1$  case corresponds to the apodized cosine.<sup>10</sup> When  $\alpha$  tends to infinity, the stretched cosine approaches the “trapezoid-cosine” waveform used by Van et al.<sup>13</sup> (but in our case we assume an infinitely short rise time, so  $\alpha = \infty$  represents an ideal situation which can never be reached in practice). When  $\alpha$  varies between these two extremes, stretched cosines allow a flexible way to increase  $b$  while preserving an acceptable gradient modulation spectrum, where the stretching exponent  $\alpha$



**FIGURE 4** Macromolecule attenuation factors calculated for each dataset on mice. The red line corresponds to the expected MM attenuation  $M_{\text{expected}} = 0.97$ , and the grey lines delimit the range of reliable data sets ( $M_{\text{expected}} \pm \text{noise}$ , corresponding to the 0.91–1.03 range). See Table 1 for the number of scans acquired at each frequency



**FIGURE 5** Averaged ADC for NAA, tCr, tCho, Ins and Tau as a function of the frequency, after dataset sorting based on the MM attenuation criterion. Error bars stand for the standard deviation for these points. The blue line represents the best fit from the neurite model for each metabolite averaged dataset

can be chosen depending on the gradient's maximal slew rate and performance in terms of eddy currents, or on the maximal acceptable contamination of secondary lobes in the gradient modulation spectrum. This is for example particularly striking when considering the secondary lobes just above 400 Hz in Figure 1C, where  $\alpha = 4$  and  $\infty$  lead to approximately doubled contamination compared with  $\alpha = 2$ . There is some similarity between stretched gradients parameterized by  $\alpha$ , ranging from  $\alpha = 1$  to infinity, and stretched hyperbolic secant RF pulses parameterized by  $n$ , ranging from  $n = 1$  (regular hyperbolic secant) to infinity (CHIRP), which also allow flexible compromise between maximal amplitude of the radiofrequency field  $B_1$  and adequate frequency selection.<sup>19</sup>

Recent studies<sup>13,20,21</sup> report the use of oscillating gradients to explore microstructure at short scales in a clinical setting. However, oscillating gradient experiments on clinical scanners remain very challenging, due to the limited maximal gradient strength. A few strategies have been proposed to optimize diffusion-weighting. The "trapezoid-cosine" waveform<sup>13</sup> can indeed be well optimized in terms of diffusion-weighting and frequency selection but is very constraining for the gradient if used at gradient's maximal capacities (rise time and strength). Lundell et al.<sup>21</sup> have introduced circularly polarized oscillating gradients, which yield twofold increased  $b$  compared with a single-direction oscillating gradient, but cannot be adapted to diffusion-weighting along the three axes simultaneously. Stretched cosines may be interesting in a clinical context and complement these existing approaches.

In this work, we have taken advantage of the higher diffusion-weighting induced by stretched gradients to reduce  $T_E$  to 60 ms, which allowed the detection of a higher number of metabolites compared with our previous study performed at  $T_E = 154$  ms in the rat brain, where only NAA, tCr and tCho were observed.<sup>6</sup> More importantly,

maybe, shorter  $T_E$  allowed the quantification of the MM peak at 0.9 ppm. This peak could subsequently be used as an objective criterion to detect and discard datasets corrupted by motion artifacts.

## 5.2 | Motion artifact associated with oscillating gradient

The observation of an intermittent artifact was completely unexpected, since we have never observed such an artifact in our past works, at least when MM signal was observable. This was generally the case in our pre-clinical studies using pulsed field gradients (PFGs), although at diffusion times longer than 1 s it was generally not possible to reliably quantify MM signal. Interestingly, some particular gradient frequencies seem to be more susceptible to this artifact than other frequencies (number of acquisitions rejected depending on the frequency: 0/29 at 35 Hz, 1/29 at 99 Hz, 21/30 at 150 Hz, 15/27 at 201 Hz, 15/30 at 252 Hz). The high rejection rate at some frequencies reduces the number of valid datasets, unfortunately increasing the standard error of the mean for the ADC at these frequencies, and imposing a very large number of experiments to retain enough usable datasets.

Generally speaking, we do not think that motion artifacts observed here can be related to any physiological process such as cardiac pulsation or respiration, because problematic frequencies do not correspond to any physiological frequency (mouse respiration rate under isoflurane is  $\sim 1$ –2 Hz, mouse heart beating rate is  $\sim 8$ –10 Hz). Even brain action potentials are too slow (maximum  $\sim 50$  Hz). Nevertheless, to assess whether this artifact could be mitigated using respiratory gating, we actually performed an additional experiment at  $\omega_{\text{eff}} = 150, 201$  and 252 Hz with respiratory gating. It turned out that respiratory gating had no effect, as we still detected a strong artifactual signal



attenuation at  $\omega_{\text{eff}} = 201$  Hz and no artifact at other frequencies. Furthermore, we wanted to verify in one *in vivo* experiment that these artifacts were not, for some reason, related to the special gradient waveforms used here. It turned out that, in this experiment, artifactual signal drop also occurred at the same problematic frequency (201 Hz) when using a standard apodized cosine.

In our opinion, the artifact observed here is related to the special nature of oscillating gradients in comparison with PFG. When using oscillating gradients, signal attenuation depends on the motion harmonics at the corresponding gradient frequency. In the meantime, gradient oscillation can potentially continuously drive mechanical vibrations at the same frequency (which is precisely the one probed by the measurement). In contrast, for PFG the potential mechanical vibrations during the diffusion time are not correlated with the diffusion time (for the simple reason that the mechanical vibrations during  $t_d$  can only be caused by the first gradient pulse). Although a previous study has reported motion artifact resulting in increased ADC (and larger error bars) at 150 Hz, including in phantom,<sup>22</sup> in our case gradient vibrations caused by oscillating gradients are certainly moderate, since we never observed artifactual signal attenuation in phantoms. However, it is perfectly conceivable that the brain enters mechanical resonance for some of these vibration frequencies, which would ultimately result in motion artifact.

The pioneering aspect of our work makes comparison with literature quite difficult. However, we can compare current results with data acquired in the rat brain at 7 T, using an equivalent oscillating gradient sequence.<sup>6</sup> It turns out that ADCs at equivalent frequencies are 20–30% higher in this past study. Species are different, but we think this is unlikely to explain this difference. More importantly, MMs were invisible because  $T_E$  was longer in the rat brain study (154 ms), so the presence of potential motion artifact cannot be ruled out in this past study, which might partly explain the higher metabolite ADC.

### 5.3 | Estimation of tissue microstructure

From recent studies at very long diffusion times in rodent, primate and human brain<sup>7–9</sup> showing that metabolite ADC is very stable, we have concluded that metabolites are not significantly confined within organelles or subcellular domains such as cell bodies, and instead primarily diffuse along fibers (axons, dendrites, astrocytic processes etc). In this context, the variation of metabolite ADC at high frequencies may be mainly interpreted and modeled in terms of restriction in the transverse plane of fibers, as also done for water.<sup>23,24</sup> This can be achieved using a model of impermeable, infinite (valid for short times) and randomly oriented (valid in first approximation in a large voxel with fibers in all orientations) cylinders, which is referred to as the “neurite model” in References 6,8. In Reference 6 we applied such a model to metabolite ADC at high frequencies, using the formalism of velocity autocorrelation function in the frequency domain by Callaghan and Stepisnik to calculate the diffusion spectrum  $D(\omega)$  (see Theory section and Equation 2), which is adapted to oscillating gradients at low  $b$  values where the phase distribution can be considered Gaussian.<sup>15,25,26</sup> For simplicity we assumed a very sharp gradient modulation spectrum without secondary lobes, resulting in a perfectly clean sampling of the diffusion spectrum, i.e.  $\text{ADC} = D(\omega_{\text{eff}})$ . A more exact

**TABLE 2** Parameters determined from neurite model for each metabolite

	$D_{\text{intra}}$ ( $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ )	Radius ( $\mu\text{m}$ )
NAA	$0.50 \pm 0.02$	$0.78 \pm 0.03$
tCr	$0.65 \pm 0.04$	$0.79 \pm 0.05$
tCho	$0.54 \pm 0.06$	$0.82 \pm 0.09$
Ins	$0.62 \pm 0.01$	$0.82 \pm 0.01$
Tau	$0.88 \pm 0.15$	$1.04 \pm 0.45$

calculation could be desirable for more accurate modeling, e.g. as performed for finite sinusoidal gradients,<sup>27</sup> or by numerical integration of  $D(\omega)|F(\omega)|^2$ , where  $F(\omega)$  could be numerically computed for the actual gradient shapes, but the goal here was to use a simple approach to obtain an estimate of typical radii and intracellular diffusivities. This yielded typical radii of about 0.9  $\mu\text{m}$  and typical intracellular diffusivities  $D_{\text{intra}} \sim 0.5\text{--}0.6 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ , corresponding to a low-viscosity cytosol ( $\sim 25\%$  higher compared with pure water).

How are the present data, where dataset sorting was performed based on MM attenuation criterion, still consistent with the neurite model? The best fits obtained with the model (see Reference 6 for mathematical details of the modeling) are shown in Figure 5, and the radius and  $D_{\text{intra}}$  for each metabolite are reported in Table 2. Standard deviations were estimated using Monte Carlo simulations (1000 repetitions). Very interestingly, it appears that the model actually yields values that are not very different from those of Reference 6, yielding radii in the 0.8–1.0  $\mu\text{m}$  range, and  $D_{\text{intra}}$  corresponding to a low-viscosity cytosol ( $\sim 20\text{--}30\%$  higher viscosity compared with pure water). Note that, if datasets corrupted by motion artifacts are not discarded, radii are estimated to be in the 1.6–1.9  $\mu\text{m}$  range, i.e. approximately doubled, while the  $D_{\text{intra}}$  remain essentially unchanged. However it should be kept in mind that the potential bias on estimated parameters induced by motion artifact may be different in different situations, depending on the relative importance of the artifact at lower or higher frequencies.

It should also be noted that measured ADCs are still less than one-third of estimated  $D_{\text{intra}}$  even at 252 Hz, so diffusion can certainly not be considered as free yet. This makes the estimation of cytosol viscosity rely a lot on the modeling. To get a more accurate estimation of  $D_{\text{intra}}$ , significantly higher frequencies would be required, e.g. using a stronger gradient coil, to experimentally measure metabolite ADC as close as possible to  $D_{\text{intra}}$ . In our opinion, the measurement of  $D_{\text{intra}}$  may be interesting beyond fundamental knowledge, because it is conceivable that massive accumulation of proteins may increase cytosol viscosity/molecular crowding in the context of proteopathies such as Alzheimer's or Huntington's disease.

## 6 | CONCLUSION

In the present work, we report a strategy to perform *in vivo* DW-MRS measurements on metabolites at ultra-short diffusion times. The new stretched cosine waveforms allow us to increase diffusion-weighting by more than 50% or, conversely, reduce  $T_E$ . Reducing  $T_E$  makes the signal of some  $J$ -coupled metabolites and MMs observable, thus providing a larger number of molecular probes to explore the intracellular space. Observing MMs actually proves crucial because, using MMs as an

internal reference of approximately null diffusivity, a quality control criterion can be proposed to discriminate unbiased ADC measurements from ADC measurements biased by some motion artifact. The methods proposed here should prove useful to probe short-range intracellular structure and viscosity using oscillating gradient DW-MRS. Finally, although the motion artifact reported here (strong artifactual signal attenuation in the absence of scan-to-scan phase variation) seems to be associated with oscillating gradients, we think it might be good practice to quantify MM signal and check the absence of motion artifact when performing PFG experiments, at least when low  $b$  values are used so that MM signal is expected to remain fairly stable.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Research Council ("INCELL" project, ERC grant 336331). The 11.7 T MRI scanner was funded by a grant from Investissements d'Avenir—ANR-11-INBS-0011—NeurATRIS: a translational research infrastructure for biotherapies in neurosciences.

## REFERENCES

- Nicolay K, Braun KP, Graaf RA, Dijkhuizen RM, Kruiskamp MJ. Diffusion NMR spectroscopy. *NMR Biomed*. 2001;14(2):94–111.
- Ronen I, Valette J. Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *eMagRes*. 2015;4:733–750.
- Cao P, Wu EX. *In vivo* diffusion MRS investigation of non-water molecules in biological tissues. *NMR Biomed*. 2016; doi: 10.1002/nbm.3481.
- Duong TQ, Sehy JV, Yablonskiy DA, Snider BJ, Ackerman JJ, Neil JJ. Extracellular apparent diffusion in rat brain. *Magn Reson Med*. 2001;45(5):801–810.
- Branzoli F, Techawiboonwong A, Kan H, Webb A, Ronen I. Functional diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of the human primary visual cortex at 7 T. *Magn Reson Med*. 2013;69(2):303–309.
- Marchadour C, Brouillet E, Hantraye P, Lebon V, Valette J. Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(12):2153–2160.
- Palombo M, Ligneul C, Najac C, et al. New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(24):6671–6676.
- Najac C, Marchadour C, Guillermier M, et al. Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *Neuroimage*. 2014;90:374–380.
- Najac C, Branzoli F, Ronen I, Valette J. Brain intracellular metabolites are freely diffusing along cell fibers in grey and white matter, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. *Brain Struct Funct*. 2016;221(3):1245–1254.
- Does MD, Parsons EC, Gore JC. Oscillating gradient measurements of water diffusion in normal and globally ischemic rat brain. *Magn Reson Med*. 2003;49(2):206–215.
- Parsons EC Jr, Does MD, Gore JC. Temporal diffusion spectroscopy: theory and implementation in restricted systems using oscillating gradients. *Magn Reson Med*. 2006;55(1):75–84.
- Gore JC, Xu J, Colvin DC, Yankeelov TE, Parsons EC, Does MD. Characterization of tissue structure at varying length scales using temporal diffusion spectroscopy. *NMR Biomed*. 2010;23(7):745–756.
- Van AT, Holdsworth SJ, Bammer R. *In vivo* investigation of restricted diffusion in the human brain with optimized oscillating gradient encoding. *Magn Reson Med*. 2014;71(1):83–94.
- Stepisnik J. Analysis of NMR self-diffusion measurements by a density-matrix calculation. *Physica B & C*. 1981;104(3):350–364.
- Callaghan PT, Stepisnik J. Frequency-domain analysis of spin motion using modulated-gradient NMR. *J Magn Reson A*. 1995;117(1):118–122.
- Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn Reson Med*. 1993;30(6):672–679.
- Pfeuffer J, Tkac I, Gruetter R. Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(4):736–746.
- Ligneul C, Palombo M, Valette J. Metabolite diffusion up to very high  $b$  in the mouse brain *in vivo*: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magn Reson Med*. 2016. doi: 10.1002/mrm.26217
- Garwood M, DelaBarre L. The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR. *J Magn Reson*. 2001;153(2):155–177.
- Baron CA, Beaulieu C. Oscillating gradient spin-echo (OGSE) diffusion tensor imaging of the human brain. *Magn Reson Med*. 2014;72(3):726–736.
- Lundell H, Sonderby CK, Dyrby TB. Diffusion weighted imaging with circularly polarized oscillating gradients. *Magn Reson Med*. 2015;73(3):1171–1176.
- Xu JZ, Li K, Smith RA, et al. Characterizing tumor response to chemotherapy at various length scales using temporal diffusion spectroscopy. *PLoS One*. 2012;7(7):e41714.
- Xu J, Li H, Harkins KD, et al. Mapping mean axon diameter and axonal volume fraction by MRI using temporal diffusion spectroscopy. *Neuroimage*. 2014;103:10–19.
- Li H, Jiang X, Wang F, Xu J, Gore JC. Structural information revealed by the dispersion of ADC with frequency. *Magn Reson Imaging*. 2015;33(9):1083–1090.
- Stepisnik J, Mohoric A, Duh A. Diffusion and flow in a porous structure by the gradient spin echo spectral analysis. *Physica B Condens Matter*. 2001;307(1–4):158–168.
- Stepisnik J. Time-dependent self-diffusion by NMR spin-echo. *Physica B Condens Matter*. 1993;183(4):343–350.
- Xu J, Does MD, Gore JC. Quantitative characterization of tissue microstructure with temporal diffusion spectroscopy. *J Magn Reson*. 2009;200(2):189–197.

**How to cite this article:** Ligneul, C., and Valette, J. (2016), Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and "short"-echo-time diffusion-weighted MRS, *NMR in Biomedicine*, doi: 10.1002/nbm.3671

## APPENDIX

To ensure that there is no major contamination in the gradient modulation spectrum  $F(\omega)$ , we can investigate the worst-case scenario of an oscillating crenel corresponding to infinite  $\alpha$ . The integral of an infinite oscillating crenel at frequency  $\omega$  is an oscillating triangle  $T(t)$ . The corresponding Fourier series of this periodic function is

$$T(t) = \frac{8}{\pi^2} \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{\sin((2k+1)\omega t)}{(2k+1)^2}. \quad (\text{A1})$$

The gradient modulation spectrum is easily found to be a series of Dirac functions with rapidly decaying amplitude at increasing frequencies:

$$F(\omega) = FT(T(t)) = \frac{8}{\pi^2} \left( \delta(\omega) + \frac{1}{9} \delta(3\omega) + \frac{1}{25} \delta(5\omega) \dots \right). \quad (\text{A2})$$

The square of the gradient modulation spectrum, which determines the contribution of the various frequencies of the diffusion spectrum to the signal attenuation (see Equation 2), is immediately determined:

$$F(\omega)^2 = \frac{8}{\pi^2} \left( \delta(\omega) + \frac{1}{81} \delta(3\omega) + \frac{1}{625} \delta(5\omega) \dots \right). \quad (\text{A3})$$

It appears that the contamination from higher frequencies is very limited; e.g., the corresponding terms are weighted by 1/81 for  $3\omega$ , 1/625 for  $5\omega$  etc, in comparison with the main frequency  $\omega$ .

Note that, in realistic situations, the gradient waveform is not infinite, so secondary lobes with potentially larger amplitude appear.

# Assessing metabolic and structural alterations of brain cells in the APP/PS1/tauP301L mouse model of Alzheimer's disease using MRS and diffusion-weighted MRS *in vivo*

Clémence Ligneul, Marco Palombo, Juliette Le Douce, Pierrick Jego, Martine Guillemier, Gilles Bonvento, Julien Valette

## SYNOPSIS

In this work we use *in vivo* MRS and diffusion-weighted MRS to detect alterations in cellular metabolism and structure in a triple transgenic APP/PS1/tauP301L mouse model of Alzheimer's disease. We are able to detect massive remodeling of metabolic content in the hippocampus, as well as subtle but significant variations in diffusion properties of astrocytic metabolites. These results are essentially consistent with the metabolic and structural signature of activated astrocyte, a cell status represented around amyloid plaques.

## PURPOSE

To probe alterations in cellular metabolism and structure in the triple transgenic APP/PS1/tauP301L (3xTg) mouse model of Alzheimer's disease (AD), using MRS and diffusion-weighted MRS *in vivo*.

## METHODS

Experiments were performed on an 11.7 T Bruker scanner ( $G_{max}=752$  mT/m), equipped with a cryoprobe. MRS and DW-MRS were acquired using our new "STE-LASER" sequence<sup>1</sup>, which consists in a diffusion-weighted stimulated echo block followed by a LASER localization block (TE/TM/TR=33.4/20/2000 ms). Four 18-months old females 3xTg mice and four control littermates (age and sex-matched) were scanned. A 28 mm<sup>3</sup> voxel was positioned around the hippocampus (**Fig. 1A**). Twelve diffusion-weighted spectra were acquired between  $b=0$  and 20 ms/ $\mu\text{m}^2$  (which is the maximal value for which SNR allows individual scan phasing in a voxel of this size). Spectra were analyzed with LCMoDel. An experimentally measured macromolecule (MM) spectrum was included in the basis-set. Signal could be reliably quantified (CRLB<5%) for NAA, total creatine (tCr), choline compounds (tCho), myo-inositol (Ins), taurine (Tau). Due to the excellent spectral resolution, creatine (Cr) and phosphocreatine (PCr) were well resolved at 4.2 ppm and could be separately quantified (CRLB<5% at all  $b$  for PCr).

Metabolite concentration were determined from spectra at  $b=0$ , relative to tCr (assumed to be at 8 mM). Statistical significance was assessed using unpaired Student's t-test. Diffusion data were first analyzed using bi-exponential fitting. To get an idea of structural parameters we also performed a fit in randomly oriented infinite cylinders, including cylinder diameter as free parameter<sup>2</sup>. Because diffusion-derived parameters are more sensitive to experimental noise than concentrations, fits were performed on signal attenuations averaged over each group. Significance of the difference was assessed using standard Monte Carlo simulation (500 draws for each group) followed by permutation test on the group-merged Monte Carlo distributions (200,000 permutations of 2x4 parameter values).

## RESULTS & DISCUSSION

Typical spectra are shown for control (**Fig. 1B**) and 3xTg mice (**Fig. 1C**), illustrating the striking metabolic remodeling. In the meantime, no atrophy was visible on images. Results are summarized in **Fig. 2**. Significant variations were observed for different metabolites. Overall, these variations exhibit some similarity with those reported in other mouse models of AD, in particular regarding the decreased NAA and increased Ins in APP/PS1 models (see ref.<sup>3</sup> and references within). Results are very similar to those recently observed in a rat model of CNTF-induced astrocytic activation<sup>4</sup>, except for the stable tCho levels reported here (*versus* increased tCho with CNTF). A striking feature (which was not significant in the rat model of astrocytic activation) is the massive lactate increase, suggesting alteration of energy metabolism. Cr and PCr are rarely resolved *in vivo*, and to our knowledge this is the first time it is reported in an AD model. Interestingly we measure a close to significance ( $p=0.06$ ) 15% increased PCr/Cr ratio in 3xTg (as opposed to the decreased ratio reported in the Q111 Huntington's disease mouse model<sup>5</sup>).

Metabolite signal attenuation for a mouse of each group is shown in **Fig. 3A** and averaged logarithm signal attenuation is shown in **Fig. 3B**. Overall, attenuation curves are very similar in both groups. However, some metabolites seem to exhibit some slightly but systematically stronger attenuation in the 3xTg group, in particular for Ins, tCho, tCr and Tau. Diffusion parameters are given in **Table 1**. Since a relatively short diffusion time was used ( $t_d=23.2$  ms), measured diffusion is mostly sensitive to short distance restriction, in particular fiber diameter<sup>2</sup>. In this context, the increased fast and slow diffusivities (from bi-exponential fit) of Ins, an astrocytic marker (together with tCho, which is also often assumed to be mainly astrocytic, and whose diffusivities also increase close to significance), might reasonably be interpreted as increased astrocytic fiber diameter. This is consistent with the characteristic hypertrophy of activated astrocytes, exhibiting in particular larger fiber diameter, and is further supported by radii extracted from the cylinder fit, which in 3xTg significantly increases by ~10% for Ins (and almost significantly for tCho) (**Table 1**). tCr, which is supposed to be present both in astrocytes and neurons, and thus should also be sensitive to astrocytic alterations, also exhibits significantly larger cylinder radius.

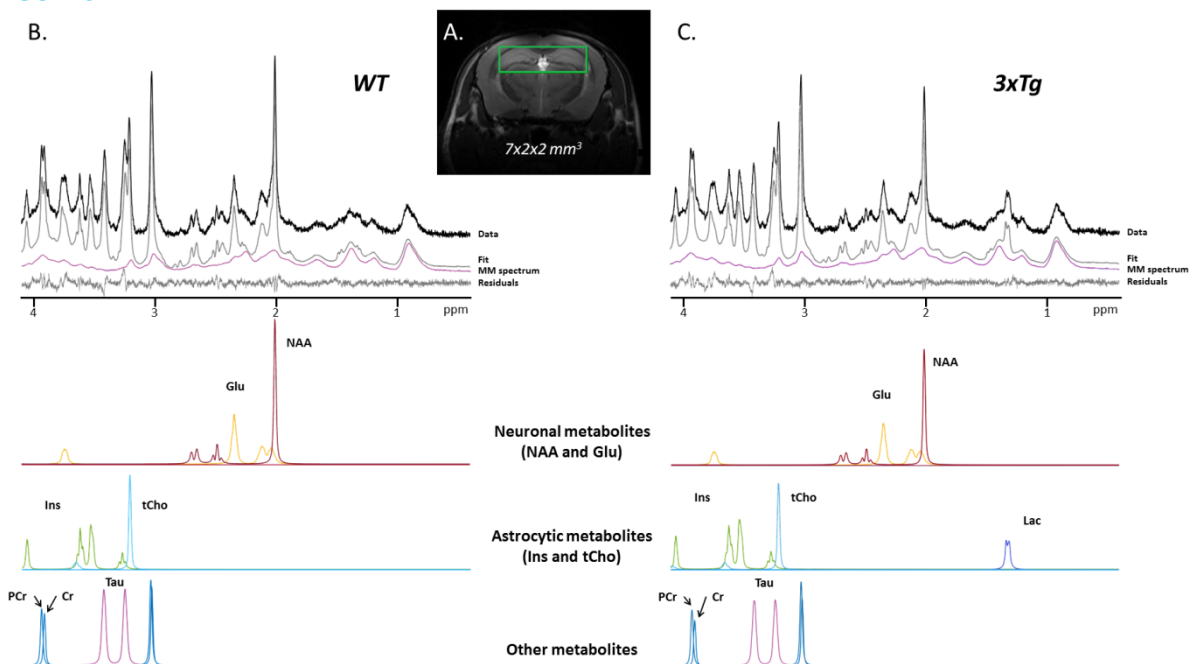
## CONCLUSION

The signature of activated, hypertrophic astrocytes (which are known to be present around amyloid plaques), as well as possible alterations of energy metabolism, are detected by MRS and diffusion-weighted MRS in the 3xTg mice hippocampus. Additional experiments are underway to consolidate these results.

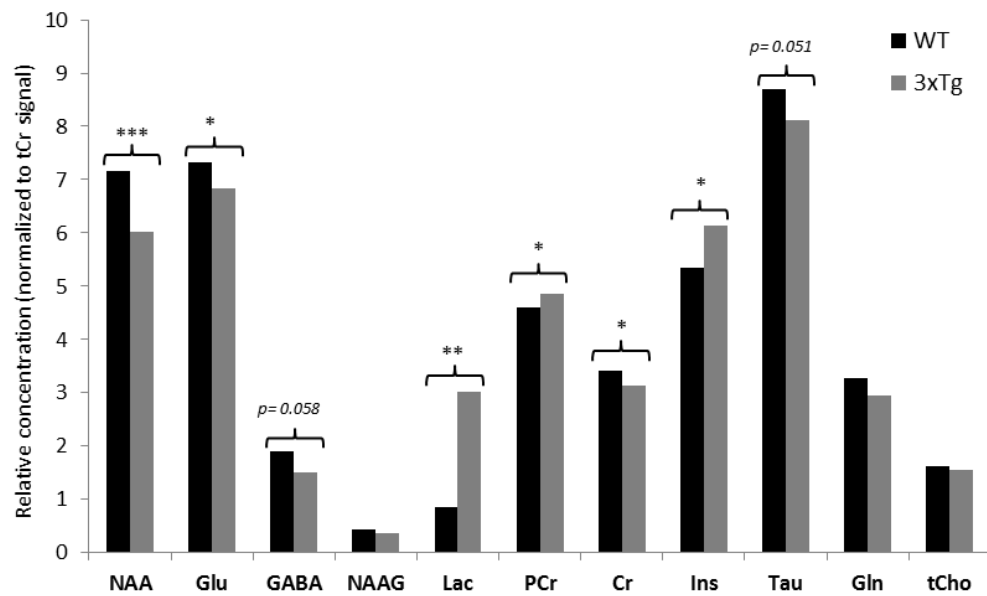
## REFERENCES

- <sup>1</sup> Ligneul C, et al. "Metabolite diffusion up to very high  $b$  in the mouse brain *in vivo*: revisiting the correlation between relaxation and diffusion properties". *This symposium*.
- <sup>2</sup> Palombo M, et al. "Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high  $b$ : diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation." *This symposium*.
- <sup>3</sup> Sabbagh JJ, et al. *Am J Neurodegener Dis*. 2013; **2**(2): 108.
- <sup>4</sup> Carrillo-de Sauvage, et al. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Jun; **35**, 917-921.

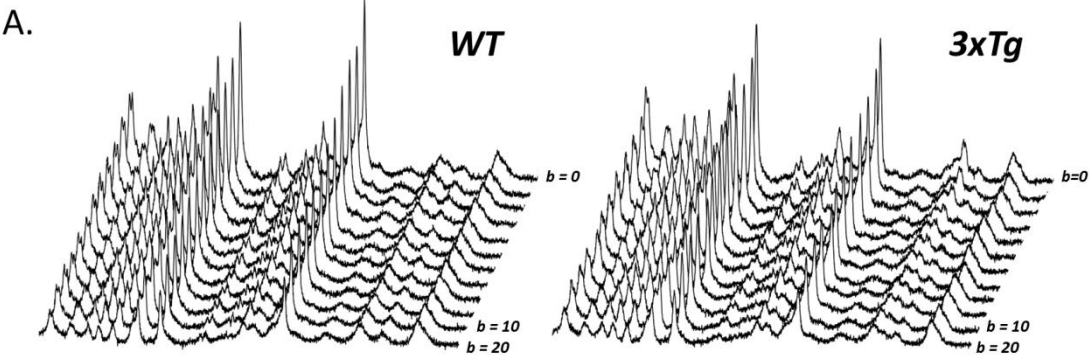
**FIGURES**



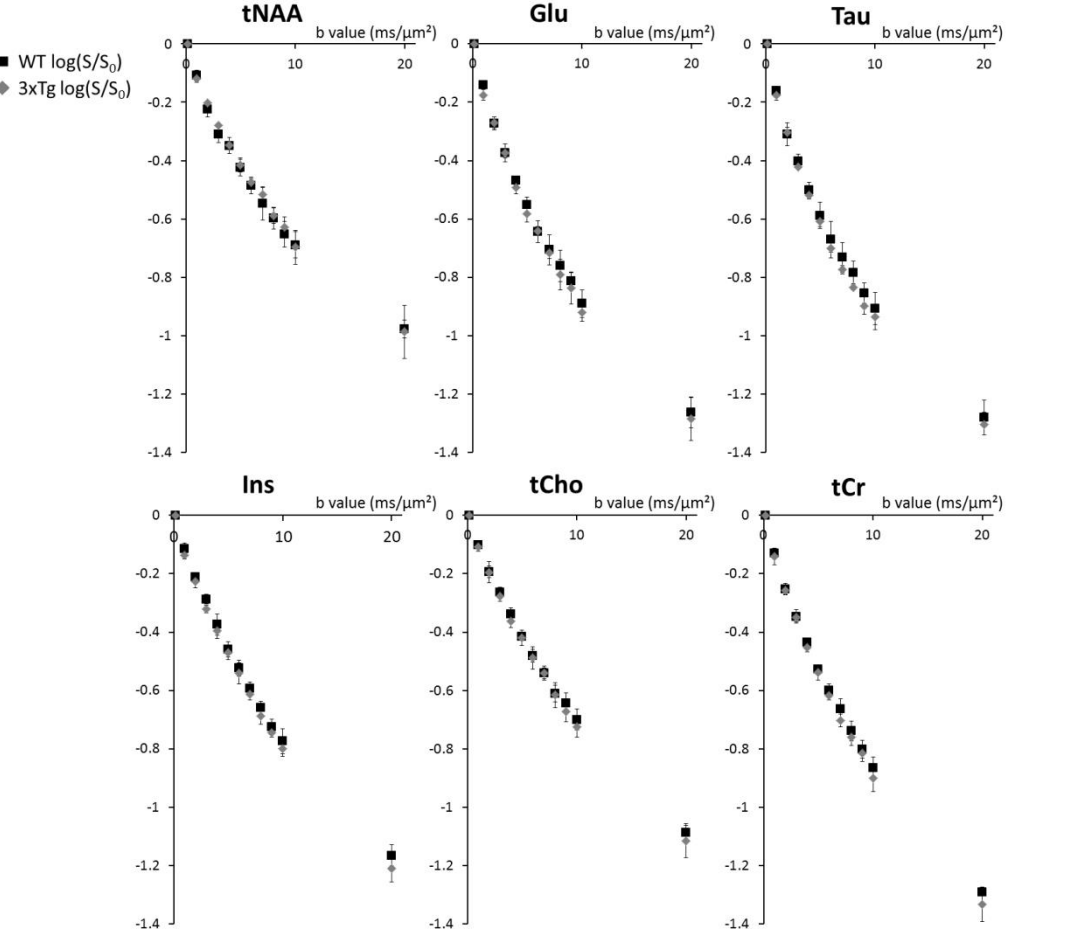
**Fig. 1:** The voxel (green rectangle) is located around the mouse hippocampus (A). Representative in vivo  $^1\text{H}$ -MRS spectra in WT mouse (B) and 3x-Tg mouse (C) acquired at  $b=0 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Spectral decomposition proposed by LCMModel is shown for metabolites with  $\text{CRLB}<5\%$ .



**Fig. 2:** Results for spectroscopy. Metabolites concentrations averaged over the 4 mice of the 2 groups. Statistical significance: \*\*\*p-value<0.001, \*\*p-value<0.01, \*p-value<0.05.



**B.** Logarithm of signal attenuation ( $S_0$ : signal at  $b=0 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) as a function of  $b$ .



**Fig. 3:** A. Representative signal attenuation in a WT mouse and a 3xTg mouse. Each data set is acquired in one mouse in a  $7 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  (Fig 1A.). B. Averaged logarithm signal attenuation over the 4 mice of the 2 groups for the 6 main metabolites. Error bars are standard deviation.

## BIEXPONENTIAL

	ADC <sub>fast</sub> (μm <sup>2</sup> /ms)			ADC <sub>slow</sub> (μm <sup>2</sup> /ms)			Slow fraction		
	<i>p-value</i>	<u>WT</u>	<u>3xTg</u>	<i>p-value</i>	<u>WT</u>	<u>3xTg</u>	<i>p-value</i>	<u>WT</u>	<u>3xTg</u>
<b>Ins (*)</b>	<b>0.02</b>	<b>0.20</b>	<b>0.27</b>	<b>0.02</b>	<b>0.028</b>	<b>0.033</b>	<b>0.03</b>	<b>0.53</b>	<b>0.63</b>
tNAA	0.72	0.24	0.25	0.39	0.061	0.258	0.50	0.59	0.62
tCho	0.60	0.22	0.22	0.46	0.031	0.033	0.87	0.62	0.62
Glu	0.27	0.29	0.31	0.55	0.034	0.035	0.86	0.55	0.56
tCr	0.26	0.28	0.27	0.64	0.040	0.039	0.13	0.60	0.57
<b>Tau</b>	<b>0.06</b>	<b>0.35</b>	<b>0.32</b>	<b>0.08</b>	<b>0.036</b>	<b>0.032</b>	<b>0.02</b>	<b>0.57</b>	<b>0.51</b>
<b>PCr (*)</b>	<b>0.02</b>	<b>0.21</b>	<b>0.28</b>	0.53	0.032	0.035	0.18	0.51	0.57

## SIMPLE CYLINDERS

	Radius (μm)		
	<i>p-value</i>	<u>WT</u>	<u>3xTg</u>
<b>Ins (*)</b>	<b>0.03</b>	<b>1.34</b>	<b>1.47</b>
tNAA	0.36	0.81	0.70
<b>tCho</b>	<b>0.07</b>	<b>1.19</b>	<b>1.27</b>
Glu	0.28	1.11	1.22
<b>tCr (*)</b>	<b>0.05</b>	<b>1.34</b>	<b>1.44</b>
Tau	0.12	0.90	1.13
PCr	0.19	1.42	1.53

Metabolite Not significant  
**Metabolite** p-value < 0.1  
**Metabolite (\*)** p-value < 0.05

**Table 1:** Results for the different fits on average data. Statistical significance is obtained by permutation test on Monte-Carlo distributions.



# Approaching free intracellular diffusion by diffusion-weighted MRS at ultra-short time scales: initial results in the rodent brain using a 1.5 T/m gradient

Clémence Ligneul<sup>1</sup>, Marco Palombo<sup>1</sup>, Julien Flament<sup>2</sup>, and Julien Valette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Imaging Research Center (MIRcen), Commissariat à l'Energie Atomique, Fontenay-aux-Roses, France, <sup>2</sup>UMS 27, INSERM, Fontenay-aux-Roses, France

## Synopsis

At ultra-short time scales, intracellular metabolites are expected to experience less restriction, so that their apparent diffusion coefficient (ADC) as measured by diffusion-weighted MRS should approach the free intracellular diffusivity in a manner which depends on small microstructural features. In this work we use a unique gradient insert capable of reaching 1.5 T/m to measure metabolite ADC in the rat brain up to 665 Hz using oscillating gradients (corresponding to 0.21-ms diffusion time in the Mitra limit), in order to approach and estimate free intracellular diffusion.

## PURPOSE

Since most metabolites detected by MRS are intracellular, their diffusion properties are expected to specifically reflect the intracellular environment. At ultra-short time scales, the apparent diffusion coefficient (ADC) will be less sensitive to restriction and approach the free intracellular diffusivity in a manner which depends on small microstructural features. To perform these kinds of measurements, oscillating gradients (OG) are considered superior to pulsed-field gradients (PFG) as they are reducing constraints on maximal gradient strength. However, the latter is still limiting to reach very short diffusion times or, more rigorously in the context of OG, very high frequencies. In this work we use a unique gradient insert capable of reaching 1.5 T/m to measure metabolite ADC up to 665 Hz in the rat brain, in order to approach free intracellular diffusion.

## METHODS

A 9-cm inner diameter gradient coil capable of reaching 1.5 T/m in 250  $\mu$ s along each axis was specially manufactured (Tesla Engineering Ltd, Sussex, England) to fit within a horizontal 7 T Agilent scanner. Trapezoidal cosine waveforms<sup>1</sup> were implemented to maximize diffusion-weighting while ramping gradients at maximal rate, and inserted in an asymmetric LASER sequence<sup>2,3</sup>. In order to detect some residual macromolecule signal to discard datasets potentially corrupted by motion artifact<sup>3</sup>, we needed to keep TE "short", hence gradient waveform duration was limited to 30 ms, resulting in TE=80 ms (considering the two waveforms surrounding the first refocusing pulse). *In vivo* experiments were performed on female rats anesthetized with isoflurane, using N=5 or N=20 periods per waveform (corresponding to 156 and 665 Hz, as determined by computation of the exact gradient modulation spectra), at  $b=0.9$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>. Scan-to-scan frequency and phase correction were performed, and spectra were analyzed with LCMoDel.

## RESULTS

Typical *in vivo* spectra are shown in Fig.1A, demonstrating the good quality and absence of spectral distortion even at N=20 where gradients were used at almost full strength. As assessed by quantifying attenuated MM signal at 0.9 ppm<sup>3</sup>, we found that two datasets (out of six) were corrupted by motion artefact at N=5, and no dataset (out of ten) was corrupted at N=20. ADC values (after removing corrupted datasets at N=5) for NAA, total creatine tCr and choline compounds tCho are given in Fig.1B. As expected for metabolites experiencing less and less restriction, ADC are increasing (by ~40%) when going from N=5 and N=20.

## DISCUSSION

While previous *in vivo* MRI and MRS studies using OG in the brain have reported maximal frequencies of ~250 Hz, here we were able to reach unprecedentedly high frequency (665 Hz) thanks to the very strong gradients. It is particularly interesting to compare the current data with data recently obtained using a similar approach (OG LASER sequence with "short" TE to detect MM and discard motion-corrupted dataset) in the mouse brain<sup>3</sup>. As shown in Fig.2, when plotted as a function of  $\omega^{-1/2}$ , both datasets are well consistent, i.e. current data at N=5 agree well with former mouse data, and data at N=20 nicely extend the trend towards higher ADC values. Going one step further and assuming that we are in the Mitra regime, we can perform a linear fit of ADC as a function of  $\omega^{-1/2}$  to extract the surface-to-volume ratio S/V and the free intracellular diffusivity  $D_0$  in a "model-free" manner, using the universal formula valid for OG<sup>4</sup>. We exclude the point acquired in the mouse brain at the lowest frequency, as it degrades the linear fit (presumably because the Mitra regime is not reached yet). The fit yields  $D_0=0.31$   $\mu$ m<sup>2</sup>/ms and  $S/V=2.86$   $\mu$ m<sup>-1</sup> for NAA ( $R^2=0.96$ );  $D_0=0.36$   $\mu$ m<sup>2</sup>/ms and  $S/V=2.53$   $\mu$ m<sup>-1</sup> for tCr ( $R^2=0.93$ );  $D_0=0.31$   $\mu$ m<sup>2</sup>/ms and  $S/V=2.39$   $\mu$ m<sup>-1</sup> for tCho ( $R^2=0.89$ ). Assuming simple cylindrical geometries, these S/V ratios respectively correspond to radii of 0.70, 0.79 and 0.84  $\mu$ m, which are realistic for typical neuronal and glial fibers. Estimated  $D_0$  are in good agreement with values extracted from modeling of high-b data in a cylindrical model<sup>5</sup>, but lower than our previous estimates based on modeling of OG data in a cylindrical model at lower frequencies (<250 Hz)<sup>2,3</sup>. As the current estimates do not rely on a geometrical model and take advantage of data acquired at unprecedentedly high frequencies, we tend to trust them more. By comparison with metabolite diffusion measured in water at 37°C, they correspond to an intracellular viscosity ~2.7-fold larger than pure water.

## CONCLUSION

Using a unique gradient and OG MRS, we could measure metabolite ADC at 665 Hz (corresponding to 0.21-ms diffusion time in the Mitra limit<sup>4,6</sup>), thus providing updated and presumably more reliable estimates of free intracellular diffusivity and viscosity.

## Acknowledgements

This work was funded by the European Research Council (grant #336331).

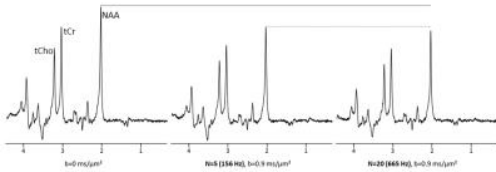
## References

1. Van AT, Holdsworth SJ, Bammer R. In vivo investigation of restricted diffusion in the human brain with optimized oscillating diffusion gradient encoding. *Magn Reson Med* 2014;71(1):83-94.

2. Marchadour C, Brouillet E, Hantraye P, Lebon V, Valette J. Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 2012;32(12):2153-2160.
3. Ligneul C, Valette J. Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and "short" echo time diffusion-weighted MR spectroscopy. *NMR in biomedicine*, in press.
4. Novikov DS, Kiselev VG. Surface-to-volume ratio with oscillating gradients. *J Magn Reson* 2011;210(1):141-145.
5. Palombo M, Ligneul C, Valette J. Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high diffusion-weighting: diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation. *Magn Reson Med*, in press.
6. Lemberskiy G, Baete SH, Cloos MA, Novikov DS, Fieremans E. Validation of Surface-to-Volume Ratio derived from Oscillating Gradient Spin Echo on a clinical scanner using anisotropic fiber phantoms. *Proc ISMRM 2016, Singapore (#13)*.

## Figures

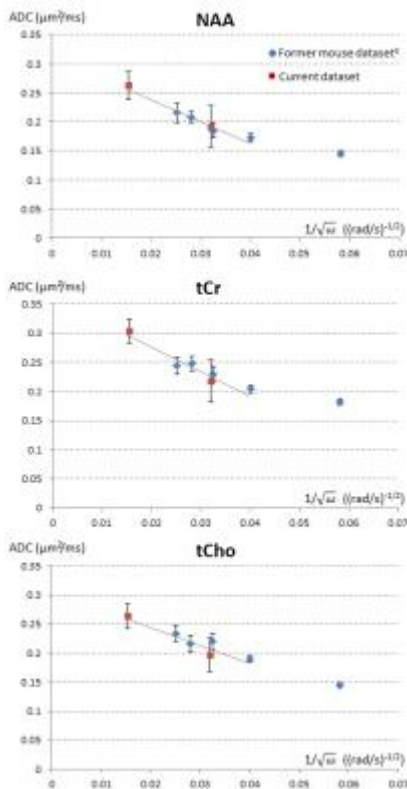
A. Example of spectra acquired in the rat brain



B. Measured ADC (in  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ )

	NAA	tCr	tCho
ADC(N=5)	0.19±0.04	0.22±0.04	0.20±0.03
ADC(N=20)	0.26±0.02	0.30±0.02	0.26±0.02

**Figure 1. A)** Spectra obtained in the rat brain at  $b=0$ , and at  $b=0.9 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  for  $N=5$  (corresponding to 156 Hz) and  $N=20$  (corresponding to 665 Hz), during a single experimental session. **B)** ADC (mean  $\pm$  standard error of the mean) measured for NAA, tCr and tCho at  $N=5$  (4 datasets) and  $N=20$  (10 datasets).



**Figure 2.** ADC of NAA, tCr and tCho as a function of  $\omega^{-1/2}$  as measured in the present work (red squares) and in a recent work using similar methodology in the mouse brain<sup>3</sup> (blue diamonds). Error bars stand for SEM. Current data at  $N=5$  agree well with former mouse data, and data at  $N=20$  nicely extends the trend towards higher ADC values in the limit of ultra-short time scales. The grey line represents the linear regression to determine  $D_0$  and  $S/V$  in the Mitra limit (see Discussion).

**Titre :** Développements méthodologiques en spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion pour l'exploration du milieu intracellulaire dans le cerveau de rongeur.

**Mots clés :** spectroscopie RMN, diffusion, cerveau, cellule, morphologie

**Résumé :** La spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion est sensible au mouvement des métabolites cérébraux (glutamate, créatine, choline, NAA, myo-inositol, taurine...), permettant de mesurer leur coefficient de diffusion apparent (CDA). Ces métabolites étant exclusivement intracellulaires, leur CDA dépend seulement du milieu intracellulaire, en particulier de la viscosité du cytosol, de la densité des structures intracellulaires, et de la forme et taille des cellules. En général, le CDA des métabolites est mesuré pour un temps de diffusion  $T_d$  de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes, leur laissant le temps de parcourir quelques micromètres et d'interagir plusieurs fois avec des structures intracellulaires. Le CDA dépend alors potentiellement de tous les paramètres intracellulaires cités plus haut, et ce de manière mal définie.

Cette thèse présente de nouvelles méthodes de spectroscopie dans le cerveau de rongeur pour mesurer le CDA pour des  $T_d$  allant de 0.2 millisecondes jusqu'à 2 secondes. Un premier jeu de mesures a été exploité par la modélisation pour extraire des paramètres clés de la morphologie des cellules du cerveau. La sensibilité des méthodes développées, en cas de variation pathologique de la morphologie des cellules, a ensuite été étudiée grâce à des souris injectées avec un facteur neurotrophique, le CNTF (ciliary neurotrophic factor). Certaines de leurs cellules, les astrocytes, deviennent massivement hypertrophiques, et les propriétés de diffusion de certains métabolites y sont sensibles. Enfin l'application à un modèle souris de la maladie de Huntington (transgénique), est présentée.

**Title :** Methodological developments in diffusion-weighted NMR spectroscopy in vivo to explore intracellular space in the rodent brain.

**Keywords :** NMR spectroscopy, diffusion, brain, cell, morphology

**Abstract :** In vivo diffusion-weighted NMR spectroscopy is sensitive to the motion of cerebral metabolites (glutamate, creatine, choline, NAA, myo-inositol, taurine...), allowing the measurement of their apparent diffusion coefficient (ADC). Since these metabolites are purely intracellular, their ADC only depends on the intracellular medium, in particular cytosol viscosity, density of intracellular structures, and the shape and size of cells. In general, metabolite ADC is measured for a single diffusion time  $T_d$ , equal to a few dozens milliseconds, leaving them time to explore a few micrometers and to interact repeatedly with intracellular structures. Their ADC then potentially depends on all intracellular parameters mentioned above, in a poorly defined way.

This thesis presents new spectroscopy methods in the rodent brain to measure ADC over an unprecedented range of  $T_d$ , from approximately 0.2 milliseconds up to 2 seconds. A first set of measurements has been modeled to extract key morphological brain cell parameters. The sensitivity of these methods to morphological changes in brain cell morphology has first been studied on mice injected with CNTF (ciliary neurotrophic factor), that causes a strong hypertrophy of a specific cell type, astrocytes. Diffusion properties of some metabolites are indeed sensitive to this massive cell morphological change. The last part presents the application to a transgenic mouse model of Huntington's disease.

