



Développement de l'imagerie métabolique par IRM-CEST : application à la maladie de Huntington

Jérémy Pépin

► To cite this version:

Jérémy Pépin. Développement de l'imagerie métabolique par IRM-CEST : application à la maladie de Huntington. Traitement du signal et de l'image [eess.SP]. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS032 . tel-01740330

HAL Id: tel-01740330

<https://theses.hal.science/tel-01740330>

Submitted on 21 Mar 2018

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.

Développement de l'imagerie métabolique par IRM-CEST : application à la maladie de Huntington

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'université Paris-Sud,
à MIRCent.

École doctorale n°575
Physique et ingénierie : électrons, photons, sciences du vivant (EOBE)
Spécialité de doctorat : Imagerie et physique médicale

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 16/02/2018, par

Jérémy PEPIN

Composition du Jury :

Guillaume DUHAMEL Chargé de recherche, Université Aix-Marseille	Rapporteur
Sandrine BETUING Maître de conférence, Université Pierre et Marie Curie (UPMC)	Rapporteur
Vincent LEBON Chef de service, Service Hospitalier Frédérique Joliot (SHFJ), CEA	Président
Fanny MOCHEL Associate professor, UPMC, INSERM UMR S1127	Examineur
Emmanuel BROUILLET Directeur de Recherches CNRS, MIRCent, CEA	Examineur
Julien VALETTE Chercheur, MIRCent, CEA	Directeur de thèse
Julien FLAMENT Ingénieur de recherche	Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Hantraye de m'avoir accueilli au sein de MIRCen et ainsi m'avoir permis de profiter de très bonnes infrastructures ainsi que de bénéficier de l'expertise de toutes les personnes travaillant dans cet environnement. Je remercie également Emmanuel Brouillet pour m'avoir reçu au Laboratoire des Maladies Neurodégénératives dans le cadre du projet HDeENERGY et également pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je voudrais aussi remercier Mme Sandrine Betuing et Mr Guillaume Duhamel pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse ainsi que Mme Fanny Mochel et Mr Vincent Lebon pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse lors de ma soutenance.

Je remercie bien évidemment toute la Team RMN, à commencer par Julien VALETTE, mon directeur de thèse officiel qui m'a permis de découvrir la puissance de la spectroscopie de diffusion (entre autres).

Merci à Julien FLAMENT, master of CEST, de m'avoir encadré durant ces trois ans de thèse. Merci d'avoir supporté ma désorganisation et de m'avoir permis de contribuer à tes travaux de recherche. Tu vas devenir une superstar du CEST je n'en doute pas !

Merci aux colocataires du bureau 110 pour cette ambiance de soutien et de convivialité qui y règne. Merci tout d'abord à Clémence Ligneul, celle avec qui j'ai partagé la quasi-totalité de cette thèse, des manips à l'ISMRM en passant par la Thaïlande ou Hawaï. Te voilà maintenant partie pour le Portugal vers une carrière scientifique qui révolutionnera le monde (rien que ça) : reste comme tu es, t'es au top ! Merci à Clémence Duffeffant et Clément Garin pour les ateliers de découvertes culturelles organisés à la coloc', les déménagements et bien évidemment les journées passées à la cave (haha). Merci aux post-docs, Marco et Nad, pour le génie et la gentillesse qu'ils nous ont su nous apporter. Merci aux « Anciens », Charlotte et Brice, pour ces séminaires d'évacuation de la frustration au PMU de Fontenay. Merci également aux 2 dernières arrivées, Mélissa et Suzanne, dont la thèse ne fait que commencer et qui sauront, sans aucun doute, perpétuer l'héritage de ce bureau 110.

Merci plus généralement à tous les autres membres de la famille étendue des doctorants de MIRCen : El Qrouplo, Kelly, Camille, Audrey, Laurène, Marianne, Anastasie, Marie, Noémie, Suzannah et bien évidemment Séverine. Je retiendrai tous les anniversaires, weekends, brunchs et autres évènements qui ont contribué à la formation de ce groupe soudé.

Merci enfin à toutes les personnes travaillant au sein de MIRCen qui assurent une atmosphère de travail chaleureuse et expérimentée.

Merci enfin à ma famille que j'espère avoir rendu fière par ce travail de thèse.

Table des matières

Remerciements	3
Introduction générale.....	15
Chapitre I : Contexte neurobiologique	19
I. Le système nerveux central.....	19
A. Structures et fonctions du cerveau	19
B. Populations cellulaires du cerveau.....	21
1. Les neurones	21
2. Les cellules gliales.....	22
II. Métabolisme énergétique cérébral.....	23
A. Métabolisme oxydatif du glucose	25
1. La glycolyse	25
2. Le cycle de Krebs	26
3. La chaîne de transport d'électrons	26
4. Métabolisme oxydatif du glucose - bilan	26
B. Métabolisme glycolytique du glucose.....	27
C. Métabolismes « alternatifs » du glucose	28
III. La maladie de Huntington (MH)	29
Chapitre II : Introduction sur l'IRM et son utilité pour le diagnostic des maladies neurodégénératives.....	33
I. Historique de la RMN	33
A. Spin nucléaire et interaction avec un champ magnétique extérieur	33
B. Relaxation	35
C. Spectroscopie RMN.....	38
1. Phénomène de déplacement chimique	38
2. Spectroscopie RMN <i>in vivo</i>	39
II. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	43
A. Localisation du signal	43
B. Notion de séquences IRM	46
III. Applications aux maladies neurodégénératives	48
Chapitre III : Imagerie CEST (Transfert de Saturation par Echange Chimique)	53
I. Historique de l'imagerie CEST	53
II. Description de l'effet CEST.....	55
A. Principe général.....	55

B.	Condition d'observation de l'effet CEST	56
C.	Transfert de saturation	60
1.	Saturation complète des protons du pool B.....	60
2.	Saturation partielle des protons du pool B	61
3.	Approximation de saturation faible	62
III.	Caractérisation de l'effet CEST	65
Chapitre IV : Imagerie CEST, une grande diversité d'applications		69
I.	Types de transfert d'aimantation.....	70
A.	Effets MTC et NOE	70
B.	Echanges chimiques	71
II.	CEST endogène (diaCEST)	74
A.	Protons amides (-NH)	75
B.	Protons amines (-NH ₂).....	76
1.	Le glutamate	76
2.	La créatine.....	77
C.	Protons hydroxyles (-OH)	78
1.	Le glycogène.....	78
2.	Le glucose.....	78
3.	Le myo-Inositol.....	80
4.	Le glycosaminoglycane	80
D.	Gène rapporteur	81
Chapitre V : Développement de l'imagerie CEST à MIRCen		85
I.	Imagerie CEST à haut champ magnétique	85
A.	Hardware	85
B.	La séquence TurboRARE	86
C.	Le module de saturation	88
II.	Calibration et post-traitement des données CEST	89
A.	Correction des inhomogénéités du champ B0	89
1.	Principe de la correction du B0 en imagerie CEST.....	89
2.	Démonstration de la méthode de correction sur un fantôme de glucose	91
3.	Intérêt de la correction des inhomogénéités du champ B0 <i>in vivo</i>	92
B.	Importance de la calibration du B1	93
1.	Cas d'une antenne volumique	93
2.	Cas d'une antenne surfacique	96

III.	Imagerie métabolique et physiologique par IRM-CEST	98
A.	Développement de l'imagerie gluCEST	98
1.	Caractérisation de l'effet gluCEST	99
2.	Détection du glutamate à haut champ	100
3.	Influence du pH sur le contraste gluCEST	102
B.	Détection du glucose par imagerie glucoCEST	103
1.	Détermination des paramètres de saturation	103
2.	Détermination du seuil de détection du signal glucoCEST	104
C.	Imagerie APT & NOE	105
Chapitre VI : Modèles animaux pour l'étude de la maladie de Huntington.....		109
I.	Une grande diversité de modèle animaux.....	109
A.	Modèles rongeurs transgéniques.....	110
B.	Modèles Knock-In	111
II.	Le modèle souris KI140.....	113
A.	Présentation générale	113
B.	Atteintes comportementales.....	113
1.	Test du rotarod	114
2.	Test de l'open-field.....	115
C.	Marquage histologique.....	116
III.	Le modèle souris R6/1.....	117
A.	Altération du comportement chez les souris R6/1.....	117
B.	Altérations cellulaires	119
IV.	Le modèle rat BACHD.....	119
A.	Mise en évidence des troubles moteurs du modèle.....	120
B.	Désordres cognitifs et altérations cellulaires chez les rats BACHD	120
C.	Morphologie générale des rats BACHD	121
V.	Protocole d'expérimentation animale.....	122
A.	Anesthésie et suivi des paramètres physiologiques.....	123
B.	Contrôle de la masse corporelle chez le rat	123
Chapitre VII : L'imagerie métabolique IRM-CEST comme biomarqueur de la maladie de Huntington		127
I.	Protocole IRM.....	127
A.	Volumétrie du striatum.....	128
B.	Profil métabolique du striatum	128

C.	Imagerie gluCEST	129
II.	Altération du métabolisme cérébral dans le modèle KI140	130
A.	Modifications morphologiques du striatum	130
B.	Etude du profil métabolique du striatum	131
1.	Détection du dysfonctionnement neuronal	131
2.	Modification du métabolisme astrocytaire	132
C.	Cartographie de la distribution du glutamate par imagerie gluCEST	133
1.	Mesures individuelles de l'effet gluCEST	133
2.	Effet du génotype sur le contraste gluCEST	135
3.	Evaluation du seuil de détection de l'effet gluCEST <i>in vivo</i>	137
4.	Interprétation des résultats d'imagerie gluCEST	138
III.	Altération du métabolisme cérébral dans le modèle R6/1	140
A.	Analyse des marqueurs traditionnels	140
B.	Mesure des concentrations de métabolites dans le striatum	141
C.	Variation de la distribution du glutamate dans le cerveau	142
IV.	Discussion générale	144
A.	Mise en évidence des altérations cellulaires spécifiques	144
B.	Complémentarité de l'imagerie gluCEST et de la SRM	144
Chapitre VIII : Etude du remodelage du métabolisme cérébral dans la maladie de Huntington		149
I.	Protocole expérimental	150
A.	Mesure du profil métabolique du striatum	150
B.	Imagerie CEST	151
II.	Résultats	152
A.	Suivi longitudinal du profil métabolique par SRM	152
1.	Stabilité des profils métaboliques	154
2.	Cas particulier du Lactate	154
B.	Suivi longitudinal de la distribution de glutamate par IRM-CEST	155
1.	Variation des cartes gluCEST des rats sauvages au cours du temps	156
2.	Variation des cartes dluCEST des rats BACHD au cours du temps	158
3.	Comparaison des variations de gluCEST entre les deux groupes	160
C.	Suivi longitudinal des altérations de pH par IRM-CEST	163
III.	Discussion et interprétation des données	165
A.	Un modèle peu sévère de la maladie de Huntington	165
B.	Réorganisations métaboliques et régulation du métabolisme énergétique	166

1.	Stabilité du pH intracellulaire	166
2.	Baisse du glutamate liée au vieillissement normal.....	167
3.	Mise en place des mécanismes de compensation ?.....	168
C.	Une utilisation différente des ressources énergétique ?	168
1.	Protocole d'intoxication aigue au 3NP.....	169
2.	Résultats.....	170
3.	Cas du lactate.....	171
IV.	Conclusion	172
	Chapitre IX : Perspectives de l'imagerie CEST	175
I.	Suivi du métabolisme énergétique par imagerie glucoCEST	175
A.	Introduction.....	175
1.	Contexte.....	175
2.	Imagerie CEST et glucose.....	176
B.	Protocoles d'injection	176
1.	Perfusion.....	176
2.	Le bolus.....	177
C.	Résultats.....	177
1.	Perfusion.....	177
2.	Bolus	178
D.	Discussion et conclusion	180
1.	A propos du 2DG et du glucose	180
2.	Limitations.....	180
3.	Conclusion.....	181
II.	Imagerie gluCEST haute-résolution du compartiment neuronal.....	181
A.	Protocole	182
B.	GluCEST haute résolution	183
1.	Une contribution axonale au contraste du glutamate ?.....	184
2.	Conclusion.....	185
	Conclusion générale.....	187
	Bibliographie.....	191

ABBREVIATIONS

ADP	Adénosine Di-Phosphate
APT	Amide Proton Transfer
ATP	Adénosine Triphosphate
B_0	Champ magnétique statique
B_1	Champ magnétique perturbateur
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer
CMRGlc	<i>Cerebral Metabolic Rate of Glucose</i>
Cr	Créatine
DAS	Débit d’Absorption Spécifique
FADH ₂	Flavine Adénine Di-Nucléotide
FID	Signal de précession libre (Free Induction Decay)
Glu	Glutamate
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
GRE	Gradient-Echos
Ins	myo-Inositol
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire
k_{ex}	Taux d’échange de protons
Lac	Lactate
LASER	Localization by Adiabatic SElective Refocusing
LDH	Lactate Déhydrogénase
MH	Maladie de Huntington
mHTT	Protéine huntingtine mutée
MSME	Multi-Slice Multi-Echos

MTC	Magnetization Transfer Contrast
NAA	N-Acétylaspartate
NADH	Nicotinamide Adénine Di-Nucléotide
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
Pi	Phosphate inorganique
ppm	Partie par million
PTR	Proton Transfer Ratio
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDH	Succinate Déshydrogénase
SE	Spin-Echos
SNC	Système Nerveux Central
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique nucléaire
T_1	Temps de relaxation longitudinale
T_2	Temps de relaxation transversale
Tau	Taurine
TE	Temps d'Echos
tCho	Composés cholinergiques
tNAA	N-Acétylaspartate total
TR	Temps de Répétition
t_{sat}	Temps de saturation
ω_0	Fréquence de Larmor
-NH	Amide
-NH ₂	Amine
-OH	Hydroxyle

Introduction générale

Avec le vieillissement de la population et l'allongement constant de la durée de vie constaté depuis plusieurs années, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Huntington ou encore de Parkinson sont en plein essor. Si à l'heure actuelle cela concerne plus d'un million de personnes en France, la proportion de la population touchée par l'une de ces pathologies du système nerveux central est vouée à exploser dans les années à venir avec plus de 200 000 nouveaux cas par an. Les troubles induits par les maladies neurodégénératives sont très variés en fonction des zones cérébrales atteintes mais ils sont en général associés à une triade de symptômes moteurs, cognitifs et psychiatriques.

Ces maladies sont caractérisées par une lente dégénérescence des cellules neuronales due à une altération de leur bon fonctionnement. Si les origines peuvent être très diverses, l'accumulation de protéines mal repliées est très souvent responsable de la neurodégénérescence et de la mort des neurones. Toutefois, la connaissance des mécanismes biologiques conduisant à cette dégénérescence reste incomplète et il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de soigner ces pathologies. L'étude des maladies neurodégénératives est donc un axe de recherche très actif car la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans ces pathologies constitue un réel enjeu de santé publique. En effet, la connaissance des différents dysfonctionnements des cellules cérébrales est primordiale à plusieurs niveaux. Cela permettrait d'identifier des biomarqueurs permettant soit de diagnostiquer de façon précoce la maladie, soit de suivre l'évolution de celle-ci au cours de temps. De plus, la possibilité d'utiliser un biomarqueur pertinent permettra à l'avenir d'évaluer l'efficacité de futurs traitements.

L'environnement de la thèse

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (UMR 9199) implanté dans MIRCen (pour Molecular Imaging Research Center), un département de l'Institut de biologie François-Jacob, situé sur le site CEA Paris-Saclay de Fontenay-aux-Roses. L'objectif principal de MIRCen est de développer de nouveaux modèles animaux (souris, rats et macaques) reflétant différentes caractéristiques des maladies neurodégénératives afin d'en comprendre les processus pathologiques impliqués et d'évaluer de nouveaux traitements, notamment grâce à l'approche de la thérapie génique. MIRCen regroupe différentes plateformes permettant de mener à bien les projets de recherche précliniques allant de l'analyse comportementale des animaux, à la chirurgie, à l'imagerie non-invasive IRM et TEP, à l'utilisation de vecteurs viraux et l'analyse post-mortem des tissus.

La plateforme IRM de MIRCen est équipée de deux scanners IRM à haut champ magnétique permettant de réaliser des acquisitions dans un environnement biologique confiné. La plateforme

comporte une IRM 7T dédiée à l'imagerie des macaques (Agilent, Palo Alto, CA, USA) et une IRM 11.7T (Bruker BioSpin, Ettlingen, Allemagne) dédiée à l'imagerie des rongeurs. De plus, l'IRM 11.7T est équipée d'une antenne cryogénique haute performance que nous avons eu l'opportunité d'utiliser durant cette thèse.

Le projet HDeENERGY

La thèse a été réalisée dans le cadre d'un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) intitulé HDeENERGY. Ce projet vise à étudier l'implication du métabolisme énergétique et en particulier les défauts du métabolisme énergétique dans le cadre de la maladie de Huntington (MH). Ce projet translationnel réalisé en partenariat avec l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) a pour but de mettre au point des méthodes innovantes et non-invasives permettant de suivre le métabolisme énergétique, d'abord dans des modèles animaux de la maladie puis d'évaluer la pertinence des biomarqueurs identifiés chez des patients souffrant de la MH. Parmi les développements méthodologiques proposés dans le projet HDeENERGY, l'imagerie CEST (pour *Chemical Exchange Saturation Transfert*) occupe une part importante qui a constitué le cœur de cette thèse.

Organisation du manuscrit

Dans une première partie, nous présenterons le contexte général qui a motivé la réalisation de cette thèse. Nous présenterons donc le contexte biologique du métabolisme énergétique ainsi que la MH. Ensuite, nous présenterons les notions théoriques et méthodologiques importantes pour cette thèse à savoir l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et en particulier l'imagerie CEST. Nous tenterons de présenter l'état de l'art de cette méthode relativement récente et son utilité pour l'étude des maladies neurodégénératives.

Dans la deuxième partie, nous exposerons les développements méthodologiques réalisés à MIRCen. L'imagerie CEST est une sorte de « boîte à outils » permettant d'imager différents métabolites ou différents paramètres physiologiques tels que le pH. Durant cette thèse, nous nous sommes concentrés sur la mise au point de l'imagerie CEST du glutamate (gluCEST), du glucose (glucoCEST) et du pH (grâce à l'imagerie de transfert des protons amides, APT). Nous avons évalué la performance et la sensibilité de ces méthodes, d'abord à l'aide de fantômes calibrés puis dans des conditions physiologiques sur des animaux sains.

Enfin, dans la dernière partie, nous présenterons les applications de ces méthodes innovantes pour l'étude de différents modèles animaux de la MH. Nous avons pu durant cette thèse utiliser trois modèles animaux différents ; deux modèles souris, les KI140 et les R6/1, reproduisant des caractéristiques différentes de la MH, le modèle KI140 étant plus caractéristique d'une évolution lente de la maladie alors que le modèle R6/1 est plus sévère et mime une forme juvénile de la MH, et un modèle rat, les BACHD, qui est également un modèle très progressif de la maladie que nous avons pu suivre de façon longitudinale. Enfin, en conclusion de ce manuscrit, nous présentons des perspectives de développements de l'imagerie CEST qui, nous l'espérons, pourraient constituer le futur de l'imagerie CEST à haut champ.

Chapitre I : Contexte neurobiologique

Les travaux de cette thèse s'inscrivant dans l'étude des maladies neurodégénératives, ce chapitre a pour but de permettre au lecteur de comprendre les principaux mécanismes impliqués dans le fonctionnement du système nerveux central. Nous présenterons tout d'abord dans ce chapitre la composition de cet organe particulier qu'est le cerveau. Nous exposerons ensuite les principaux processus énergétiques mis en jeu pour maintenir l'intégrité des cellules cérébrales. Enfin, nous présenterons la maladie de Huntington et les dérégulations des mécanismes énergétiques associés à cette maladie neurodégénérative.

I. Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est composé de l'encéphale (contenant le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet) et de la moelle épinière. Le SNC a pour fonction principale de réceptionner les informations transmises par le système nerveux périphérique (constitué des nerfs sensitifs et moteurs), de les traiter, de les intégrer et enfin de transmettre des messages nerveux afin d'assurer la communication entre les différentes parties du corps et permettre ainsi à l'individu d'interagir avec son environnement. Les travaux de cette thèse étant appliqués à l'étude du cerveau, nous nous concentrerons sur cet organe.

A. Structures et fonctions du cerveau

Le cerveau est constitué de deux hémisphères séparés par le sillon interhémisphérique (ou scissure longitudinale). On distingue habituellement deux types de tissus cérébraux : la substance grise, composée principalement de corps cellulaires, et la substance blanche, composée essentiellement de fibres axonales myélinisées (**Figure I.1a**). Cette classification est basée sur la teinte naturelle du tissu cérébral, issu de la couleur blanche de la myéline.

Le cerveau est composé de différentes structures, siège de fonctions propres. Tout d'abord, une partie externe appelée cortex qui est composé de substance blanche recouvert d'une couche de corps cellulaires (substance grise). Il est possible de dissocier deux parties : le paléocortex, contenant l'hippocampe et le système olfactif, et l'isocortex (ou néocortex), lui-même divisé en 4 lobes ayant chacun une fonction spécifique (**Figure I.1b**). On trouve premièrement le lobe frontal qui est essentiellement consacré aux fonctions motrices et prémotrices ainsi que de la plupart des fonctions cognitives « supérieures » comme le langage et le raisonnement. Situé à l'arrière du lobe frontal, le

lobe pariétal a une fonction d'intégration des informations sensorielles, on parle de fonctions associatives. Le lobe occipital, localisé à l'arrière du cerveau, est formé des aires visuelles primaires. Et il y a enfin le lobe temporal qui traite les informations auditives et également des processus plus complexes tels que la mémoire. Il est également relié à l'hippocampe qui est également impliqué dans les fonctions mémorielles et d'apprentissage.

La partie interne du cerveau est composée d'une zone de substance grise appelée noyaux gris centraux. Ils ont pour rôle de relayer l'information nerveuse transmise le long des fibres provenant du cortex ou de la moelle épinière. Les deux principaux noyaux sont le striatum, constitué du noyau caudé et du putamen et gérant principalement la coordination motrice, et le thalamus, dont le rôle principal est de relayer et de réguler les flux sensoriels provenant du système nerveux périphérique (**Figure I.1c**).

Toutes les structures définies précédemment ont une organisation bilatérale c'est-à-dire qu'elles sont divisées en une partie droite et une partie gauche relativement indépendantes. Les deux hémisphères du cerveau sont reliés entre eux par une structure presque exclusivement composée de fibres et dont le rôle est d'assurer la communication entre ces deux hémisphères : le corps calleux (**Figure I.1c**).

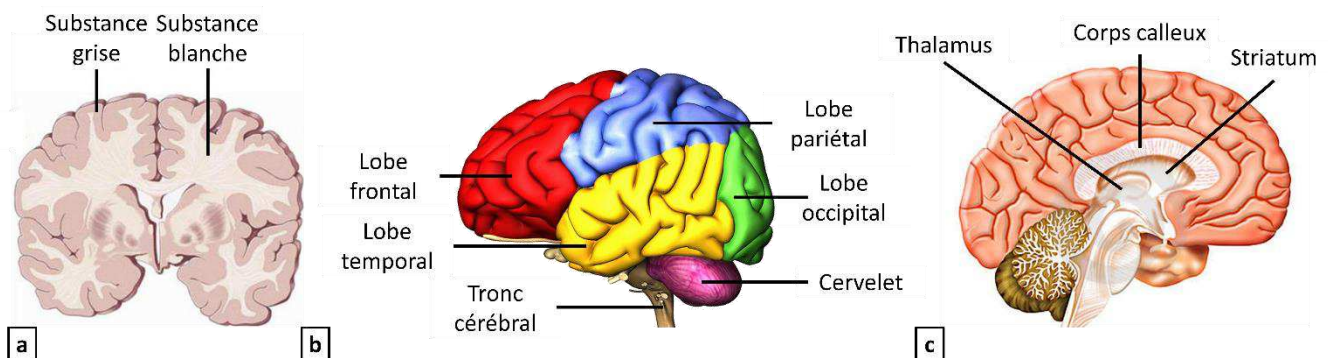


Figure I.1 : Organisation et composition de l'encéphale

- a. Type de tissus cérébraux rencontrés : substance grise et substance blanche.
- b. Les 4 lobes composant le cortex cérébral (frontal, temporal, pariétal, occipital), le cervelet et le tronc cérébral.
- c. Parties internes du cerveau : le corps calleux reliant les deux hémisphères, le striatum et le thalamus.

B. Populations cellulaires du cerveau

Le cerveau est constitué de deux principaux types de cellules : d'une part les cellules neuronales, spécialisées dans la réception, le traitement et la transmission de l'influx nerveux, et les cellules gliales comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales qui assurent le bon fonctionnement des neurones. Dans cette partie, nous décrirons chacune des cellules en présentant leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles.

1. Les neurones

Morphologie générale

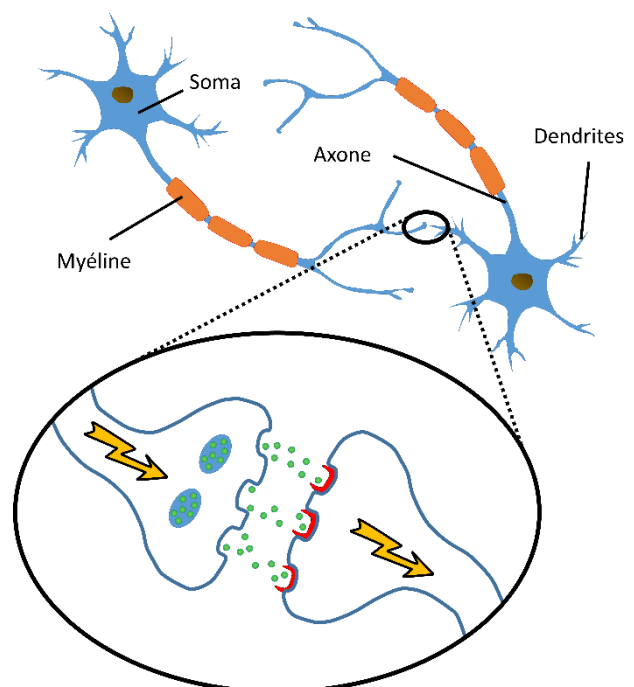
La structure des cellules neuronales est très différente des autres cellules. Elle se compose d'un corps cellulaire (ou soma) pouvant avoir des formes variées (arrondie, pyramidale) et mesurant parfois jusqu'à une centaine de microns de diamètre. Ce corps cellulaire est constitué d'un noyau central ainsi que du cytoplasme, commun à toutes les cellules. Les neurones sont caractérisés par des prolongements du cytoplasme qui leur donnent une morphologie si spécifique. La plupart de ces prolongements, appelés dendrites, sont relativement courts et permettent d'améliorer les connexions avec les neurones voisins en augmentant la surface de contact. Chaque neurone possède également un prolongement plus long, nommé axone, qui est généralement unique et enveloppé de myéline pour permettre la transmission de l'influx nerveux pour des connexions plus longues : la myéline a pour fonction d'accélérer la vitesse de transmission. Chaque axone et dendrite possède un bouton synaptique à son extrémité qui est le point de connexion par lequel le signal sera reçu ou transmis à un autre neurone. La connexion entre les boutons synaptiques respectifs de chaque neurone s'appelle la synapse (**Figure 1.2**).

Figure 1.2 : Représentation schématique simplifiée du fonctionnement d'une synapse.

L'influx nerveux, symbolisé en jaune, est converti en particules chimiques (neurotransmetteurs) afin de transmettre l'information à travers la fente synaptique.

Le bouton synaptique récepteur capte ces neurotransmetteurs et encode l'information chimique sous forme de signal électrique.

La myéline (orange) permet d'accélérer la vitesse de transmission de l'influx nerveux.



L'influx nerveux, également nommé potentiel d'action, est un signal électrique se propageant à travers le neurone. Même s'il existe des synapses dites électriques où deux neurones sont en contact direct, la plupart des connexions synaptiques présentent un espace appelé fente synaptique séparant les deux neurones connectés. Pour transmettre le message d'un neurone à l'autre, le signal est alors converti en éléments chimiques appelés neurotransmetteurs qui sont ensuite libérés dans la fente synaptique puis captés par les récepteurs synaptiques du second neurone : on parle alors de synapse chimique. Le message est à nouveau encodé sous la forme d'un signal électrique (**Figure 1.2**). Les neurones forment ainsi une chaîne dont la communication est unidirectionnelle. Un neurone est en contact avec plusieurs autres neurones dont il reçoit les messages chimiques. Tous ces messages sont ensuite pris en compte dans la constitution du message nerveux à transmettre. L'ensemble des cellules assurant la transmission du signal forme un réseau complexe et hiérarchisé qui permet un transport rapide et efficace de l'information.

2. Les cellules gliales

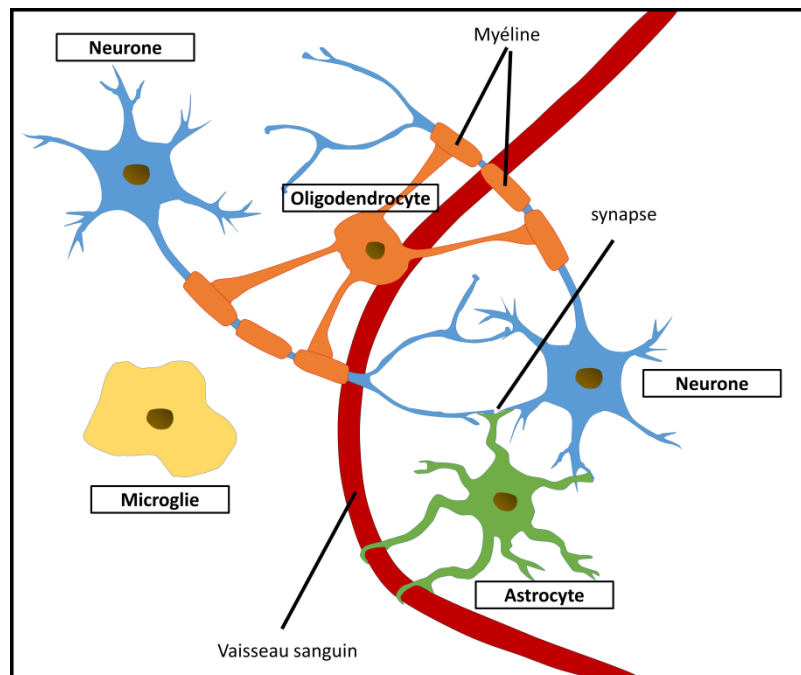
Les cellules gliales représentent plus de la moitié des cellules du cerveau humain (Azevedo et al., 2009) et assurent un rôle de soutien du SNC. Elles relient notamment les cellules nerveuses aux vaisseaux sanguins afin de permettre l'apport des nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du SNC. On distingue trois principaux types de cellules gliales (**Figure 1.3**) :

- Les astrocytes sont des cellules de forme étoilée qui garantissent le support métabolique et la synthèse des principaux constituants du système nerveux. Elles participent notamment au maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE) agissant comme un filtre des vaisseaux sanguins pouvant contenir certaines toxines potentiellement dangereuses, et jouent également un rôle immunitaire et réparateur en cas d'altération des neurones.
- Les cellules microgliales sont la principale défense immunitaire du système nerveux : elles détectent et phagocytent les agents infectieux ainsi que les débris neuronaux.
- Les oligodendrocytes fabriquent la myéline entourant les axones pour accélérer la vitesse de transmission de l'information.

Figure 1.3 : Population cellulaire cérébrale.

On distingue 4 types de cellules dans le cerveau :

- Les neurones (en bleu)
- Les astrocytes (en rouge)
- Les oligodendrocytes (en orange)



II. Métabolisme énergétique cérébral

Tout système en fonctionnement requiert de l'énergie pour assurer le bon fonctionnement des différents rouages le composant ainsi que pour préserver leur intégrité. Cette assertion est particulièrement vraie pour le cerveau qui est un très gros demandeur en ressources énergétiques. En effet, il représente moins de 5% de la masse totale du corps humain mais consomme à lui seul environ 20% des réserves d'adénosine triphosphate (ATP) qui est la molécule « universelle » de l'énergie. Cette énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules est régulée par un certain nombre de réactions chimiques regroupées sous l'appellation de métabolisme énergétique. On distingue deux composantes du métabolisme :

- le catabolisme, correspondant à l'ensemble des réactions de dégradations moléculaires. Ce sont des réactions d'oxydation produisant de l'énergie de façon spontanée : on parle de voies exergoniques.
- l'anabolisme, correspondant à l'ensemble des réactions de synthèse. Il s'agit ici de réactions de réduction qui nécessitent un apport en énergie pour avoir lieu : on parle également de voies endoergoniques.

Dans le cerveau, l'énergie générée par les réactions de catabolisme permettent la réalisation de travaux cellulaires anaboliques parmi lesquels on distingue trois types :

- Le travail de synthèse chimique, comme par exemple la synthèse de protéines à partir d'acides aminés.
- Le travail chimio-osmotique, qui a pour rôle de maintenir les potentiels membranaires en maintenant un équilibre osmotique entre la cellule et son environnement (homéostasie).
- Le travail mécanique, qui assure le transport de molécules ou de particules vers la cellule (réactions d'endocytose) et hors de la cellule (réactions d'exocytose).

Le substrat principal utilisé pour la production énergétique est le glucose. Une fois transporté dans les cellules, il peut suivre différentes voies métaboliques que nous détaillons dans les paragraphes suivants (**figure I.4**).

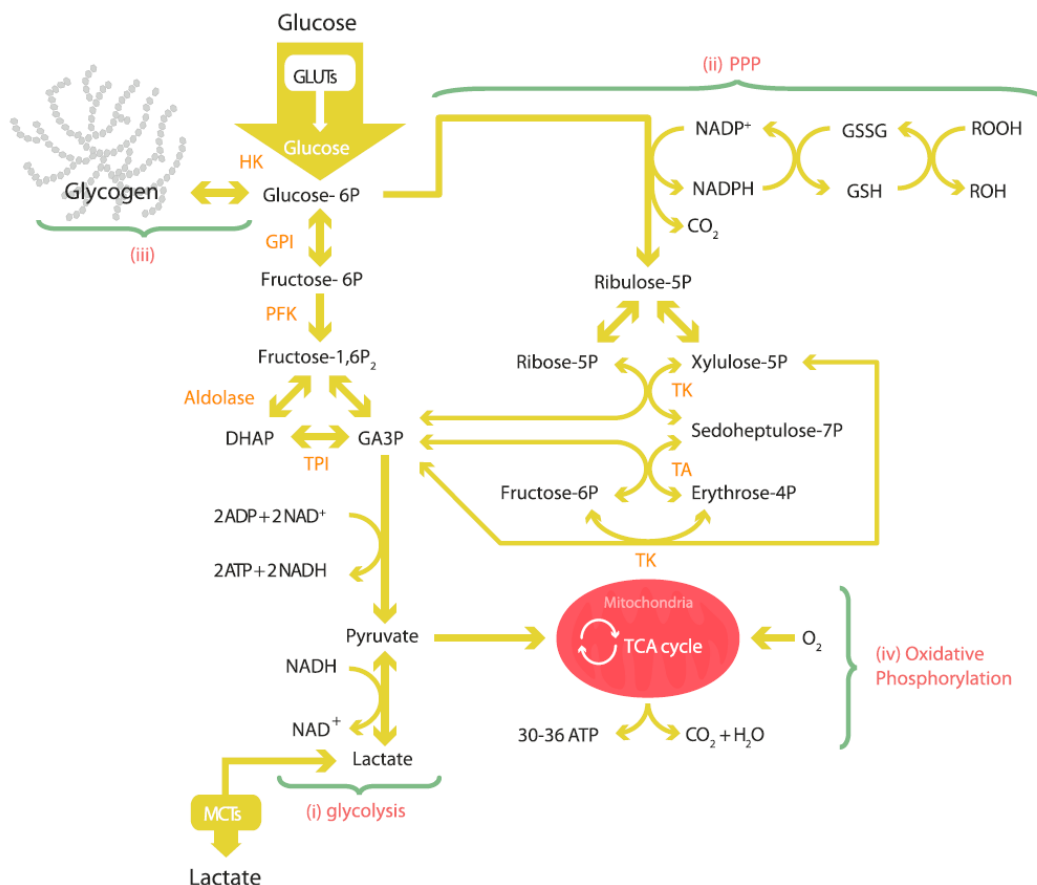


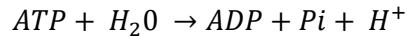
Figure I.4 : Schéma représentatif du métabolisme du glucose (Figure extraite de Magistretti et al., 2015).

Lorsque le glucose entre dans les cellules, il est phosphorylé par l'enzyme hexokinase (HK). Le produit de cette réaction peut ensuite être dégradé selon 3 différents mécanismes : la glycolyse (i), la voie des pentoses phosphates (ii) ou peut être stocké sous forme de glycogène (iii).

Le pyruvate, extrait à partir de la glycolyse, est quant à lui dégradé grâce au mécanisme de phosphorylation oxydative (iv).

A. Métabolisme oxydatif du glucose

L'ATP est considérée comme étant la source principale d'énergie et est universelle pour l'ensemble des cellules du vivant. La molécule d'ATP est un nucléotide formé d'une adénine liée à un ribose auquel sont reliées trois fonctions phosphate. Ce dernier tronçon est très instable et facilement hydrolysable c'est-à-dire que des groupements de phosphate peuvent aisément se détacher par une simple réaction avec une molécule d'eau. L'hydrolyse de l'ATP est donc une réaction exergonique dont le produit est l'adénosine di-phosphate (ADP) et le phosphate inorganique (Pi).

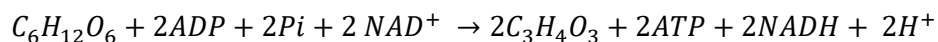


L'énergie libérée par cette réaction est ensuite transférée à des processus endoergoniques grâce à des enzymes spécifiques de couplage qui permettent le transfert du groupe phosphate de l'ATP sur le substrat de la réaction : on parle alors de phosphorylation.

Pour garder ce flux d'énergie constant, le stock d'ATP est continuellement renouvelé à partir de l'énergie fournie par les nutriments issus de la consommation tels que le glucose, et le dioxygène provenant de la respiration. La principale voie de synthèse de l'ATP est effectuée par le mécanisme de respiration cellulaire aérobie. Ce mécanisme peut être divisé en 3 étapes : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne de transport d'électron.

1. La glycolyse

La première étape de la respiration cellulaire aérobie passe par un mécanisme de dégradation du glucose ($C_6H_{12}O_6$). Cette opération appelée glycolyse a lieu dans le cytoplasme de la cellule. Elle débute tout d'abord par une séparation de la molécule de glucose en deux molécules de pyruvate ($C_3H_4O_3$). La dégradation se poursuit en dix étapes successives (**Figure 1.4**) dont les cinq premières représentent la phase dite d'investissement d'énergie pendant laquelle les molécules d'ATP sont consommées pour permettre la phosphorylation des molécules combustibles. Les cinq étapes suivantes représentent la phase durant laquelle des molécules d'ATP et de nicotinamide adénine di-nucléotide (NADH) sont synthétisées. On peut donc écrire l'équation-bilan de la glycolyse :



A l'issue de cette réaction de dégradation du glucose, le pyruvate produit peut suivre des voies différentes en fonction des organismes ou des conditions physiologiques du milieu. Dans les astrocytes, ou en situation anaérobie dans les neurones, le pyruvate subit une fermentation pour être converti en lactate (voire paragraphe **1.B**). En condition aérobie, il intègre la mitochondrie où il subit une décarboxylation oxydative par un complexe enzymatique appelé pyruvate déshydrogénase entraînant la production d'acétylCo-A une molécule de $NADH + H^+$.

2. Le cycle de Krebs

L'acétylCo-A, issu de la décarboxylation oxydative du pyruvate, sera ensuite totalement dégradée à l'issue d'une série de réactions permettant de synthétiser différents acides tricarboxyliques appelées le cycle de Krebs, ou *TCA cycle* en anglais pour *tricarboxylic acid cycle* (Krebs, 1940) (**Figure 1.4**). A chaque étape du cycle (les étapes du cycle de Krebs ne sont pas détaillées sur la **figure 1.4**), l'acétylCo-A est oxydée et deux atomes de carbone sont libérés sous forme de CO₂, pour ensuite être éliminés dans le sang, et aboutit sur la création de coenzymes réduits de NADH et de flavine adénine dinucléotide (FADH₂). Ces coenzymes constituent la réserve énergétique issue de la dégradation du glucose et sont ensuite utilisées pour produire de l'énergie par phosphorylation oxydative.

3. La chaîne de transport d'électrons

La chaîne de transport d'électrons est un ensemble de complexes protéiques disposés à la surface de la membrane interne de la mitochondrie. Ces complexes vont libérer l'énergie de façon contrôlée en transférant les électrons des nutriments, stockés sous forme de coenzyme, à l'oxygène. En d'autres termes, les coenzymes réduits NADH, H⁺ et FADH₂ subissent une série de réactions d'oxydoréduction. A ceci s'ajoutent des transferts de protons H⁺ de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane interne qui vont créer une forte différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane. On parle alors de pompes à protons.

Ainsi, le NADH est réoxydé aux complexes I, II et IV et le FADH₂ transfère ses électrons au niveau du complexe II (Succinate désydrégénase, SDH). De cette manière, on remarque que le rendement énergétique du NADH + H⁺ est plus important que FADH₂ puisque ce dernier ne produit que 1,5 mole d'ATP contre 2,5 pour le NADH + H⁺.

4. Métabolisme oxydatif du glucose - bilan

En résumé, le glucose entre dans les cellules par des transporteurs dédiés et est dégradé au travers des différents processus décrits au-dessus. L'étape de glycolyse donne lieu à la production de 2 moles d'ATP, 2 moles de pyruvate et 2 moles de NADH + H⁺. Lorsque le milieu environnant est en condition aérobie, le pyruvate entre dans la mitochondrie pour être oxydé. Par conséquent, l'oxydation complète d'une molécule de glucose produit entre 30 et 32 molécules d'ATP, conférant à la phosphorylation oxydative un excellent rendement énergétique.

La voie métabolique présentée dans ce paragraphe a longtemps été considéré comme la voie presque exclusive d'utilisation du glucose par les cellules du cerveau et en particulier par les neurones. Cependant, des travaux récents ont montré l'existence d'autres voies métaboliques qui jouent un rôle prépondérant permettant de soutenir une demande énergétique importante et de maintenir une activité cellulaire suffisante. Ces voies sont présentées ci-après.

B. Métabolisme glycolytique du glucose

En fonction de l'environnement physiologique, et notamment lorsque le milieu est en condition hypoxique, ou en fonction du type cellulaire, le pyruvate peut être réduit en lactate par une enzyme, la lactate déshydrogénase (LDH). Environ 10% du glucose entrant dans le cerveau est converti en lactate par glycolyse et la fermentation lactique y compris en condition aérobie (Vaishnavi et al., 2010). Cette dernière réaction ne produit pas d'ATP mais permet de stocker de l'énergie sous forme de lactate qui peut ensuite être libérée dans le milieu extracellulaire. La voie métabolique conduisant au lactate est couramment appelée fermentation aérobie.

Cette voie métabolique peut avoir lieu dans les neurones ou les astrocytes. Cependant, il a été montré que la fermentation aérobie était prédominante dans les astrocytes (Pellerin and Magistretti, 1994) à tel point que l'on peut vraiment parler de spécificité cellulaire quant à l'utilisation du substrat énergétique. Ainsi, le métabolisme des neurones est essentiellement oxydatif lorsqu'ils ne sont pas privés en oxygène alors qu'il est plus glycolytique dans les astrocytes, comme le montrent les flèches de couleur claire sur la **figure 1.5** (Bélanger et al., 2011; Fahmeed Hyder et al., 2006; Magistretti and Allaman, 2015).

Dans le cas des neurones, une grande partie (voire une majorité) de l'énergie consommée est utilisée à des fins de signalisation au niveau synaptique, l'ensemble du pyruvate produit étant oxydé dans les mitochondries. Afin de pouvoir répondre à des demandes énergétiques supplémentaires, par exemple lors d'une stimulation, les neurones doivent pouvoir utiliser un substrat alternatif pour produire de l'énergie. Une hypothèse a été proposée il y a une vingtaine d'années suggérant que le lactate produit par les astrocytes et libéré dans l'espace extracellulaire pouvait servir de substrat alternatif pour être converti en pyruvate par la LDH et ensuite être oxydé dans les mitochondrie (Pellerin and Magistretti, 1994). Lors d'une activation cérébrale, les neurotransmetteurs, le glutamate en l'occurrence, sont libérés dans la fente synaptique. Les concentrations mises en jeu pour assurer la transmission du signal étant très faibles, la concentration extracellulaire en glutamate se doit d'être très finement régulée. Le glutamate est donc recapté rapidement par les astrocytes et converti en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine étant non neuro-active, elle peut être libérée dans l'espace extracellulaire pour être recaptée par les neurones et convertie en glutamate. L'action de la glutamine synthétase consomme une molécule d'ATP. Le lactate produit dans les astrocytes par glycolyse est donc libéré et recapté par les neurones pour être oxydé et soutenir cette demande énergétique. Cette hypothèse porte le nom de Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle (ANLS) mais elle constitue encore à l'heure actuelle un sujet de vifs débats au sein de la communauté.

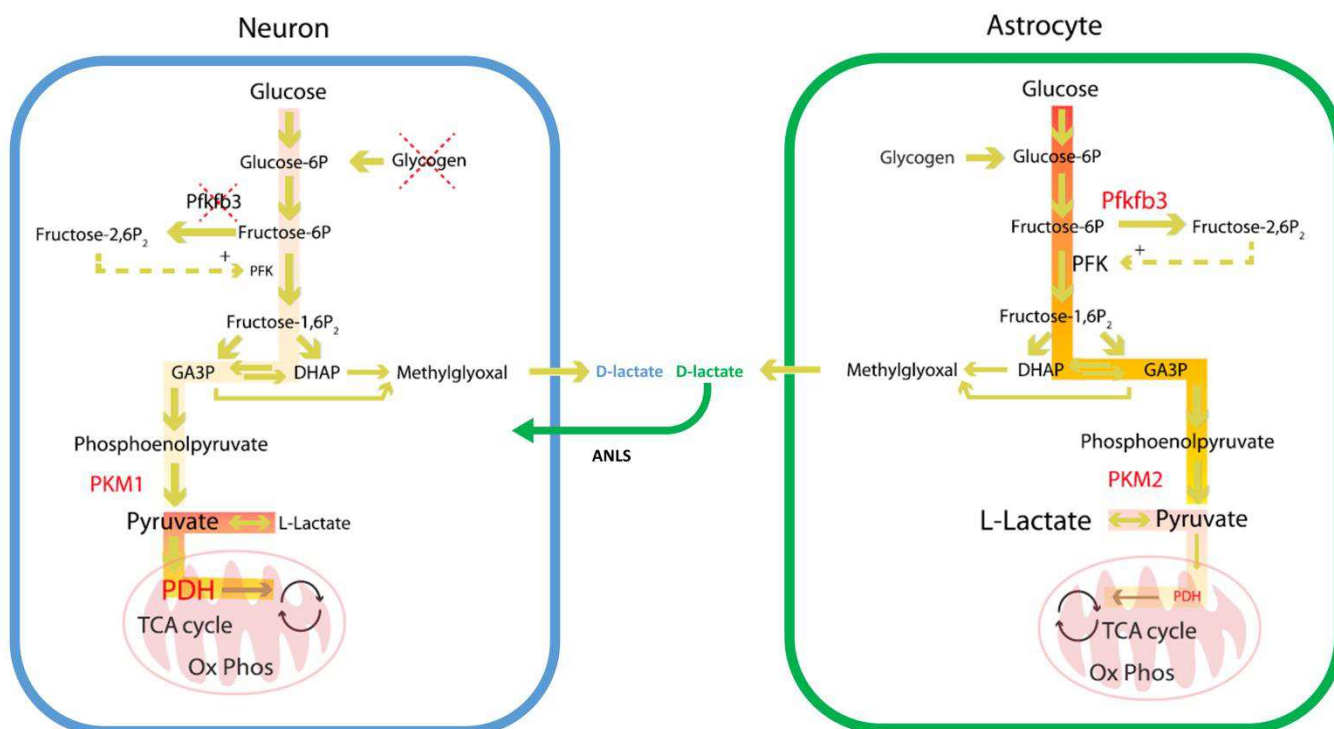


Figure 1.5 : Métabolisation du glucose dans les neurones et les astrocytes. (Figure adaptée de Magistretti et al., 2015).

L'encadré bleu désigne le compartiment neuronal et son métabolisme majoritairement oxydatif.

L'encadré vert désigne le compartiment astrocytaire et son mécanisme majoritairement glycolytique.

Le métabolisme du glucose dans ces cellules libère du lactate dans le compartiment extracellulaire qui est ensuite capté à nouveau par les neurones (Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle, symbolisé par la flèche verte).

C. Métabolismes « alternatifs » du glucose

En dehors des deux voies métaboliques présentées ci-dessus, le glucose peut également suivre d'autres voies une fois entré dans les cellules. Le cerveau est un organe en fonctionnement permanent et l'évolution l'a doté de très peu de réserves propres. En effet, le glucose ne peut pas être stocké sous cette forme et les neurones ne possèdent pas la capacité de stocker de l'énergie. Dans les astrocytes en revanche, le glucose peut, après phosphorylation par l'hexokinase en glucose-6-phosphate, être converti en glycogène (**Figure 1.4**). Le but de cette réaction est de permettre au cerveau de pouvoir stocker une petite réserve énergétique qui peut ensuite être utilisée en cas de demande soudaine lors d'une tâche intense et soutenue.

Enfin, après phosphorylation par l'hexokinase, le glucose-6-phosphate peut suivre une quatrième voie qui est la voie des pentoses phosphates (ou PPP pour *pentose phosphate pathway*). Ce métabolisme peut être réalisé aussi bien en condition aérobie ou anaérobie. Les rôles de cette voie sont essentiellement la production de riboses qui entrent dans la synthèse des acides nucléiques, la production également de précurseurs aux acides aminés aromatiques et enfin de fournir du NADPH qui permet à l'organisme de fournir une défense pour le stress oxydatif.

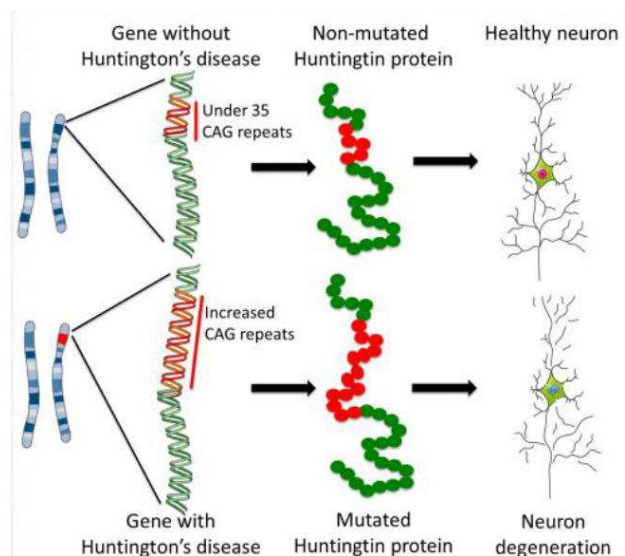
Ces mécanismes énergétiques peuvent intervenir de façon très complexe et l'ensemble des conditions ne sont à l'heure actuelle toujours pas totalement connues. Néanmoins, la finalité de ces voies conjointes et leur spécificité à certains types cellulaires permet d'assurer aux cellules cérébrales un apport suffisant en énergie à tout moment. Aussi, on comprend que la moindre perturbation de ce système complexe peut engendrer de graves répercussions sur le métabolisme général, ce qui est notamment le cas dans nombre de maladies neurodégénératives.

III. La maladie de Huntington (MH)

La maladie de Huntington (MH) est une maladie génétique héréditaire et est fatale en générale environ 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. La MH est due à une mutation sur le chromosome 4 du gène IT15 (Gusella et al., 1983) qui sera ensuite désigné comme le gène *htt*. L'exon 1 de ce gène contient normalement une répétition de trois nucléotides (C (cytosine), A (adénine) et G (guanine)) avec un nombre d'occurrences variant de 6 à 35 chez les personnes saines. Lorsque le nombre de répétitions du triplet CAG est supérieur à 35, la protéine huntingtine (HTT) codée par ce gène est mal repliée, lui conférant des fonctions toxiques pour les neurones (**Figure 1.6**).

Figure 1.6 : Influence du nombre de répétitions CAG dans le gène codant pour la protéine huntingtine.

Les répétitions supplémentaires du triplet CAG dans le gène codant pour la protéine huntingtine va générer une protéine mutée qui aura pour conséquence de provoquer la dégénérescence des cellules neuronales.



Cette maladie neurodégénérative se définit par des désordres cognitifs, psychiatriques et moteurs associés à l'agrégation de la protéine HTT mutée dans les cellules neuronales ainsi qu'à des atrophies préférentielles de certaines structures cérébrales telles que le cortex et le striatum (Harper, 1992). Ces

atrophies sont parfaitement visibles en IRM comme le montre la **figure 1.7**. Ainsi, on peut observer une atrophie du striatum comprenant le putamen et le noyau caudé (Harris et al., 1996). La diminution du volume striatal commence dès les stades précoces de la maladie (Rosas et al., 2003) et certaines études ont montré une corrélation forte entre le nombre de répétitions du triplet CAG, l'atrophie du striatum et la durée depuis laquelle les symptômes sont déclarés (Paulsen et al., 2008; Tabrizi et al., 2012), ce qui fait du striatum un biomarqueur potentiel de la MH. Une réduction du volume du cortex, progressant avec la maladie, est également rapportée chez les patients Huntington (Rosas et al., 2008), tout comme l'altération de la substance blanche autour du striatum et dans le corps calleux (Hobbs et al., 2010; Tabrizi et al., 2013) qui pourrait être à la source des problèmes de coordination de mouvements.

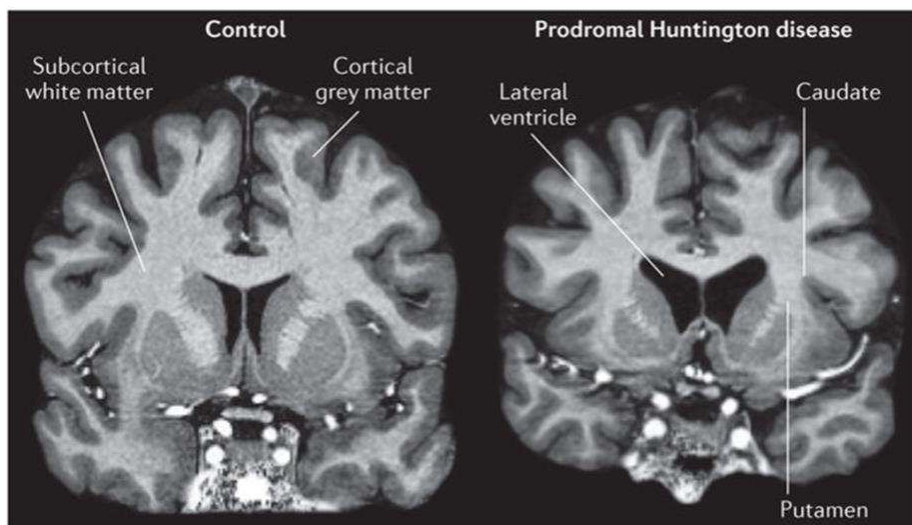


Figure 1.7 : Mesure de l'atrophie cérébrale dans la maladie de Huntington par IRM.

Comparaison du volume cérébral chez un patient en bonne santé et un patient atteint de la maladie de Huntington. (Bates et al., 2015)

En dépit de nombreux efforts réalisés dans le domaine de la biologie cellulaire et des compréhensions des mécanismes fondamentaux régulant les processus biologiques, les mécanismes sous-jacents liés à la dysfonction cérébrale et conduisant à la mort des neurones ne restent que partiellement connus et compris. Ceci s'explique probablement par la grande variété de fonctions de la protéine Htt. En effet, il est étrange de constater que bien qu'étant une protéine ubiquitaire, c'est-à-dire présente potentiellement dans l'ensemble des cellules, certaines cellules sont plus vulnérables que d'autres à la protéine mutée (mHtt), en particuliers les neurones striataux. Toutefois, la mHtt semble affecter de nombreux processus cellulaires tels que la transcription (Sugars and Rubinsztein, 2003), la neurotransmission, l'homéostasie du calcium (Cowan and Raymond, 2006), l'autophagie et surtout le métabolisme énergétique (Bossy-Wetzel et al., 2008; Damiano et al., 2010; Mochel and Haller, 2011; Mochel et al., 2007) dans les neurones et les astrocytes.

Ce dernier point est important car une hypothèse forte pouvant expliquer l'atteinte sélective de certains neurones est que la dégénérescence serait due à des perturbations des mécanismes de

régulation énergétique au niveau des mitochondries (Beal, 2005; Beal et al., 1992; Brouillet et al., 1999). Bon nombre d'études semblent indiquer que des changements métaboliques apparaissent durant le stade asymptomatique chez les porteurs de la mutation progressant durant l'établissement de la maladie et conduisant à la neurodégénérescence. Cela semble donc indiquer que le métabolisme énergétique joue un rôle important dans la physiopathologie de la MH. La possibilité de caractériser à des stades précoces ces altérations du métabolisme pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la pathologie. Cela permettrait également d'identifier des biomarqueurs peut-être plus pertinents ou reflétant mieux les processus biologiques mis en jeu que des modifications structurales macroscopiques comme l'atrophie du striatum. La recherche de biomarqueur de la MH est un axe fort de cette thèse et les développements méthodologiques présentés dans les chapitres suivants ont été fait dans cet objectif.

Chapitre II : Introduction sur l'IRM et son utilité pour le diagnostic des maladies neurodégénératives

Depuis une trentaine d'années, l'IRM est devenue une technique de choix pour l'exploration des tissus mous de façon non-invasive avec une très bonne résolution spatiale. Dans ce chapitre, nous présenterons les principes physiques à l'origine du signal mesuré en RMN. Nous présenterons également l'utilisation de ce signal pour la spectroscopie RMN (SRM) et l'imagerie (IRM). Enfin, dans une dernière partie, nous exposerons brièvement les caractéristiques et les intérêts principaux de ces méthodes non-invasives pour l'étude et le diagnostic de certaines maladies neurodégénératives, notamment étudiées au sein de MIRCen.

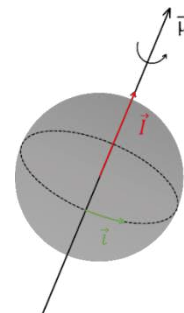
I. Historique de la RMN

A. Spin nucléaire et interaction avec un champ magnétique extérieur

Un atome est constitué de nucléons (les protons, chargés positivement, et les neutrons) et d'électrons (chargés négativement) gravitant autour du noyau. Par conséquent, un atome peut être représenté comme une sphère en rotation sur elle-même induisant un champ magnétique appelé moment magnétique ($\vec{\mu}$) (**Figure II.1**). Le moment magnétique $\vec{\mu}$ est défini par son moment angulaire intrinsèque (ou spin) $\vec{I}$ vérifiant la relation : $\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I}$ avec γ le rapport gyromagnétique de l'atome considéré et $\hbar$ la constante de Planck réduite ($\hbar = \frac{h}{2\pi}$).

Figure II.1

Représentation du courant ($\vec{i}$) et des moments magnétique ($\vec{\mu}$) et cinétique ($\vec{I}$) du proton.



En 1936, Rabi, Alvarez et Ramsey sont parvenus pour la première fois à observer ces moments magnétiques en utilisant une méthode, dérivée des travaux de Stern et Gerlach (1922). Cette expérience consiste à envoyer des atomes d'argent sous forme de jet atomique dans un champ magnétique soumis à des gradients de champ selon les 3 axes de l'espace (x, y, z). Il en résulte que le faisceau est scindé en deux en raison de l'existence d'une grandeur appelée moment cinétique de spin,

ou simplement spin. Dès lors, l'étude des interactions des moments magnétiques $\vec{\mu}$ avec le champ externe deviendra une discipline à part entière de la physique nucléaire : la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Pour comprendre la provenance du signal RMN, observons le système de spins à son état d'équilibre. Lorsqu'un noyau est soumis à un champ magnétique extérieur noté $\vec{B}_0$, ces interactions sont caractérisées par une énergie de couplage E telle que :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma \hbar \vec{I} \cdot \vec{B}_0 \quad (\text{II.1})$$

En se plaçant dans le cas où le spin I vaut $\frac{1}{2}$ comme pour le proton par exemple, et si on considère l'induction $\vec{B}_0$ suivant un axe O_z mais de sens opposé (**Figure II.2a**), seulement deux niveaux d'énergie (α et β), correspondant aux deux valeurs que peut prendre le spin ($-\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{2}$), sont observés :

$$E_\alpha = \frac{\gamma B_0 \hbar}{2} \text{ et } E_\beta = -\frac{\gamma B_0 \hbar}{2} \quad (\text{II.2})$$

Cette énergie, dépendante de l'intensité du champ $\vec{B}_0$, conduit à une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie α et β créant ainsi un déséquilibre dans la répartition des spins. Cette propriété est appelée l'effet Zeeman.

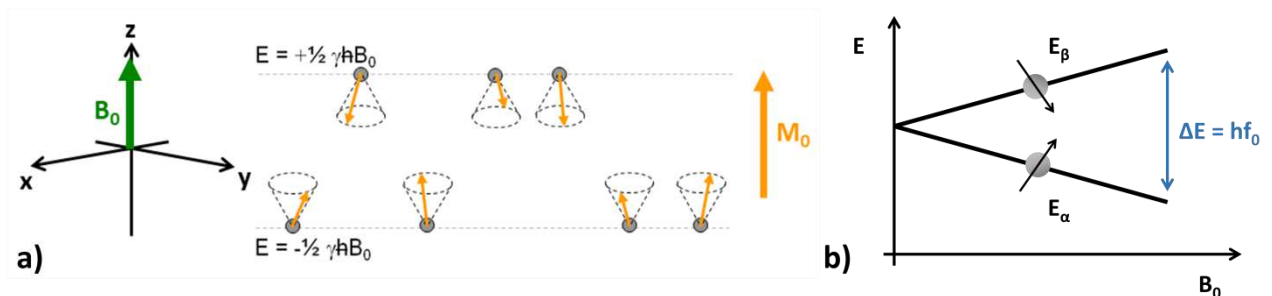


Figure II.2 : Représentation de l'effet Zeeman.

- Les spins sont dans un état d'énergie soit haut (E_α) soit bas (E_β). La proportion légèrement plus grande de spins à l'état E_β crée une aimantation macroscopique $\vec{M}_0$.
- La différence de niveau d'énergie est dépendante de l'intensité du champ magnétique $\vec{B}_0$. L'aimantation macroscopique $\vec{M}_0$ est donc proportionnelle au champ $\vec{B}_0$.

La répartition des niveaux d'énergie à l'équilibre obéit à la loi statistique suivante, élaborée par Maxwell et Boltzmann : $\frac{N_\alpha^0}{N_\beta^0} = e^{\frac{\Delta E}{kT}}$ (avec N_α^0 et N_β^0 , le nombre de protons aux niveaux d'énergie α et β , respectivement ; k , la constante de Boltzmann ($k = 1,38062 \text{ J.K}^{-1}$) et T , la température de l'échantillon (en K)).

Il en résulte une proportion plus importante de noyaux dans un état d'énergie plus bas (β) du fait de l'orientation imposée par $\vec{B}_0$. Bien que très faible, cette surpopulation est malgré tout suffisante pour générer une aimantation macroscopique $\vec{M}_0$ dans le sens du champ externe définie par la formule :

$$M_0 = \frac{nB_0(\gamma\hbar)^2}{4kT} \quad (\text{II.3})$$

avec n la densité de spins, T la température et k la constante de Boltzmann.

Ainsi, le nombre de spins au niveau d'énergie β augmentera avec l'intensité du champ. Le signal potentiellement détectable en RMN est donc proportionnel à l'intensité du champ magnétique statique (**Figure II.2b**). Par conséquent, d'après l'équation II.3, on comprend aisément pourquoi de nombreux développements technologiques visent à augmenter l'intensité des spectromètres RMN ou des scanners IRM.

B. Relaxation

Pour pouvoir observer l'aimantation, il faut perturber l'équilibre atteint lors de la levée de dégénérescence. Cela revient à induire des transitions énergétiques entre l'état « basse énergie » vers l'état « haute énergie ». La quantité d'énergie à fournir au système pour induire cette transition correspond à la différence d'énergie entre les 2 états, soit $\Delta E = \gamma \hbar B_0$.

D'après la relation de Planck-Einstein, il est possible de relier l'énergie d'une onde électromagnétique à sa fréquence : $E = hf$ (h étant la constante de Planck). Ainsi, pour fournir une quantité d'énergie ΔE , il suffit d'appliquer une onde électromagnétique (ou radiofréquence) telle que $hf = \gamma B_0 \hbar$. On en déduit la fréquence de résonance (appelée également fréquence de Larmor) f_0 des spins des protons soumis au champ $\vec{B}_0$ telle que $f_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ (on parle souvent de pulsation ou de fréquence angulaire $\omega_0 = 2\pi f_0$). La fréquence de Larmor est donc dépendante de l'intensité du champ : la fréquence de Larmor du proton vaut 500,3 MHz pour un champ magnétique B_0 de 11,7 Teslas. L'application de l'onde radiofréquence (RF) va donc faire « basculer » l'aimantation, orientée selon l'axe z , dans le plan transverse (xOy).

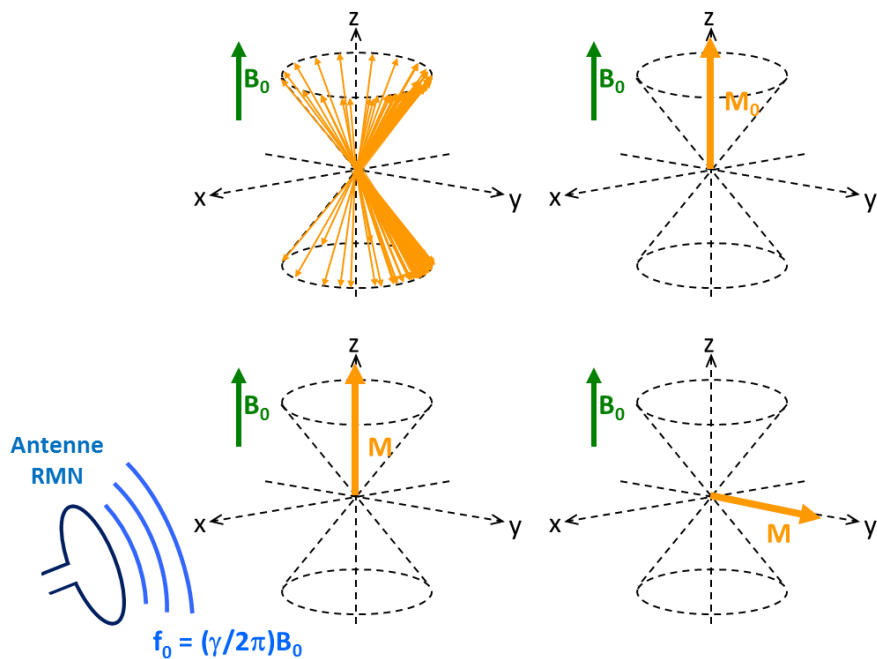


Figure II.3 : Evolution de l'aimantation des spins (flèches jaunes) après perturbation du système par une onde RF avec un angle de bascule de 90° dans le plan transverse.

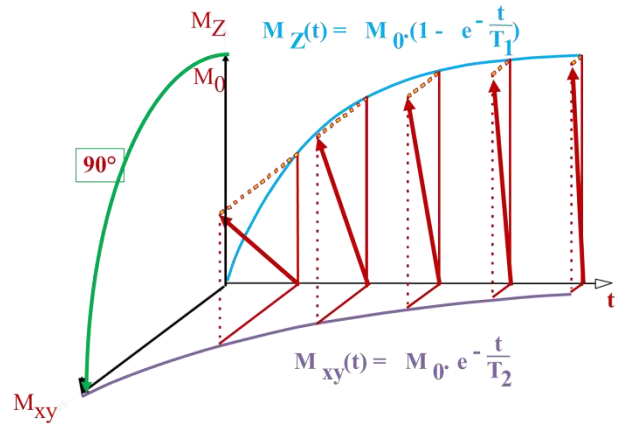
La somme des aimantations individuelles des spins (exposées sur la partie en haut à gauche de la figure) crée une aimantation macroscopique $\vec{M}_0$ (en haut à droite). Puis lorsque la perturbation est appliquée à la fréquence de Larmor grâce à une antenne, l'aimantation $\vec{M}_0$ est basculée dans le plan transverse.

Dès lors que la perturbation transitoire n'est plus appliquée, les spins sont soumis à diverses influences qui entraînent un retour à l'équilibre de l'aimantation par un mouvement de précession autour de l'axe z . Ainsi, l'aimantation longitudinale M_z retrouve progressivement sa valeur M_0 d'origine (relaxation longitudinale ou relaxation spin-milieu) tandis que l'aimantation transversale M_{xy} redevient nulle (relaxation transversale ou relaxation spin-spin).

Ces phénomènes de relaxation sont décrits mathématiquement par les équations de Bloch (1946). Lorsque l'aimantation est initialement à l'équilibre ($M_z(0) = M_0$), la relaxation longitudinale, majoritairement due aux mouvements des molécules, se définit par $M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{\frac{-t}{T_1}}\right)$ et la relaxation transversale, issue du déphasage provoqué par les champs induits par les spins des noyaux voisins, peut s'écrire sous la forme $M_{xy}(t) = M_0 e^{\frac{-t}{T_2}}$ (**Figure II.4**). Les temps de relaxation T_1 et T_2 sont des grandeurs intrinsèques propres à chaque tissu pour un champ magnétique donné et définissent la vitesse à laquelle les aimantations longitudinale et transversale retournent à leur état d'équilibre.

Figure II.4 :

Evolution des aimantations longitudinale (M_z) en bleu et transversale (M_{xy}) en violet après perturbation avec un angle de bascule de 90° dans le plan transverse.



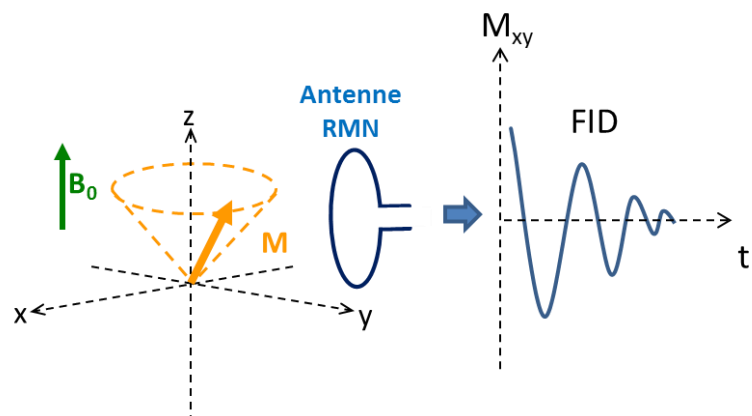
On peut également considérer la relaxation transverse T_2^* qui, en plus des interactions spin-spin, dépend des inhomogénéités du champ $\vec{B}_0$, les changements locaux de susceptibilité magnétique ainsi que la présence d'éléments paramagnétiques.

Le signal sera donc défini par $M_{xy}(t) = M_0 e^{\frac{-t}{T_2^*}}$

avec $T_2^* < T_2$.

L'aimantation dans le plan transverse M_{xy} correspond donc à une onde sinusoïdale amortie en T_2 (**Figure II.5**). Pour acquérir le signal, il suffit d'approcher une boucle (ou bobine) à proximité de l'échantillon : la précession de l'aimantation va ensuite induire un flux magnétique engendrant une force électromotrice, et donc un courant, dans cette boucle. La boucle (correspondant à l'antenne de détection) permet donc de mesurer le signal de précession libre (ou free induction decay en anglais, FID) dans le domaine temporel. Il est nécessaire d'utiliser la transformée de Fourier pour convertir ce signal temporel en un signal fréquentiel.

Figure II.5 : Acquisition du signal de précession libre (FID).



C. Spectroscopie RMN

1. Phénomène de déplacement chimique

Au début des années 1950, Dickinson et Proctor introduisent la notion de déplacement chimique. Comme évoqué précédemment, le champ $\vec{B}_0$ affecte non seulement les protons mais aussi les électrons. Au sein d'une molécule plongée dans un champ magnétique, les différents atomes sont soumis au champ magnétique statique $\vec{B}_0$ mais sont également soumis aux interactions magnétiques avec leurs proches voisins. En effet, le nuage électronique des atomes voisins crée également un petit champ magnétique local induit par les mouvements électroniques. C'est ce que l'on appelle le phénomène d'écrantage. Ainsi, chaque atome sera soumis à un champ magnétique effectif dépendant de sa position au sein de la molécule :

$$B_{eff} = B_0 + B_{induit} = B_0(1 - \sigma) \quad (II.4)$$

Avec $B_{induit} = \sigma \cdot B_0$ et σ , la constante d'écran caractéristique de la circulation et de la distribution des électrons en fonction de la géométrie de la molécule.

La fréquence de résonance pour un atome donné de la molécule vaut alors $\omega_{eff} = \gamma B_0(1 - \sigma)$. On comprend donc que pour une même molécule, les différents atomes non-équivalents présenteront une fréquence de résonance différente dépendant de leur position dans la molécule.

Le déplacement chimique se définit par la formule suivante :

(II.5)

$$\delta = 10^6 \frac{\omega_{eff} - \omega_{ref}}{\omega_{ref}}$$

Il s'exprime en partie par million (ppm) qui est une unité de fréquence normalisée. Elle présente donc l'intérêt d'être indépendante du champ $\vec{B}_0$.

ω_{ref} correspond généralement à la fréquence du tétraméthylsilane (TMS) fixée arbitrairement à 0 ppm.

Ainsi, l'analyse de ces déplacements chimiques permet de déterminer la structure des molécules faisant de la RMN un outil précieux pour l'étude structurale des molécules en chimie ou des interactions entre différentes molécules en biologie.

2. Spectroscopie RMN *in vivo*

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ou SRM est une technique qui permet d'acquérir un signal RMN au sein d'un volume d'intérêt, appelé voxel, sous la forme d'un spectre fréquentiel reflétant les différents environnements électroniques d'un noyau donné. L'analyse des fréquences et des intensités de chacun des pics composant le spectre permet de déterminer les groupes de protons mis en jeu. La SRM est donc un outil précieux pour la chimie analytique car elle permet d'identifier et de caractériser des composés connus ou non.

En plus de cet aspect analytique, la SRM appliquée à des échantillons biologiques permet d'accéder de façon non-invasive à des mesures de molécules impliquées dans des processus biologiques tels que le métabolisme cérébral. L'acquisition d'un signal RMN ne peut se faire que sur des noyaux possédant un moment magnétique de spin non nul. Bien que plusieurs noyaux présentent un intérêt important pour les applications *in vivo* tels que le carbone 13 (^{13}C) ou le phosphore 31 (^{31}P) (**Tableau II.1**), nous présenterons uniquement les aspects de la SRM du proton (^1H) dans le cadre de cette thèse.

Noyau	Spin	Rapport gyromagnétique ($\cdot 10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	Fréquence de Larmor à 11,7 T (MHz)	Abondance naturelle (%)	Intérêt <i>in vivo</i>
^1H	1/2	26,752	500,13	99,99	Identification de métabolites et de leur concentration
^{31}P	1/2	10,841	202,457	100	Etude des molécules phosphorylées impliquées dans le métabolisme cérébral (ATP, phosphate inorganique, ...)
^{13}C	1/2	6,728	125.758	1,07	Très important pour la détermination de structure chimique de molécules contenant des atomes de carbone : utilisé notamment pour l'étude du métabolisme du glucose
^{17}O	5/2	-3,628	67,8	0,04	Etude de l'oxydation du glucose

Tableau II.1 : Récapitulatif des caractéristiques des noyaux principalement utilisés en RMN et de leur intérêt pour l'étude du métabolisme.

De par son rapport gyromagnétique important et son abondance naturelle élevée, le proton est le noyau dont la détection par RMN *in vivo* est la plus favorable. Ces propriétés en font le candidat idéal pour l'étude des tissus biologiques : l'utilisation de la SRM *in vivo* permet ainsi d'accéder à des mesures associées à la composition tissulaire de différents organes tels que le cerveau ou les muscles mais également d'obtenir des informations cruciales relatives au fonctionnement des cellules. Pour pouvoir étudier de façon spécifique une structure d'intérêt, il est nécessaire de localiser le signal dans l'espace. Ceci est réalisé à l'aide de gradients de champ magnétique créant une dépendance spatiale de la fréquence de résonance (le fonctionnement de ces gradients, adapté à l'imagerie, sera exploré de façon plus précise dans la partie C de ce chapitre). Cette technique de localisation est communément appliquée en spectroscopie, notamment par l'utilisation des séquences PRESS (Point RESolved Spectroscopy – (Bottomley, 1987)), STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode - (Frahm et al., 1987)) ou, comme c'est le cas pour cette thèse, la séquence LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing – (Slotboom and Streutker, 1991)). Le détail des séquences de SRM localisées ne sera pas présenté dans ce manuscrit. Néanmoins, pour plus d'informations, le lecteur pourra se référer à l'ouvrage « *In vivo* NMR spectroscopy, Principles and Techniques » de Robin de Graaf.

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté le contexte neurobiologique dans lequel s'inscrit ce travail de thèse. Dans ce cadre-là, la SRM *in vivo* se révèle particulièrement intéressante pour l'étude des maladies neurodégénératives car elle permet d'accéder à une mesure intracellulaire du métabolisme cérébral qui peut être altéré dans des conditions pathologiques. L'application de la SRM du proton dans le système nerveux permet donc d'être sensible à divers métabolites d'intérêt dont la concentration endogène dans le cerveau permet une détection avec une bonne sensibilité (de l'ordre du millimolaire (mM)). La quantification de ces métabolites est réalisée grâce au logiciel LCMModel (Provencher, 1993) dont l'analyse s'effectue par combinaison linéaire de spectres caractéristiques de molécules supposées présentes dans le voxel. Un exemple de spectre proton acquis dans le striatum d'une souris à 11,7 T est présenté sur la **figure II.6** : les principaux métabolites observés dans le cerveau sont le N-acétylaspartate (NAA), le glutamate (Glu), la glutamine (Gln), l'inositol (Ins), la créatine (Cr), la choline (Cho) et la taurine (Tau).

Les concentrations extracellulaires des métabolites observés par SRM étant très faibles (de l'ordre du μM), la contribution au signal RMN est considérée comme majoritairement intracellulaire. De cette manière, certains métabolites peuvent être associés à un type de cellules spécifique. Pour rappel, on distingue principalement quatre types de cellules dans le système nerveux central : les neurones et les cellules gliales comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie.

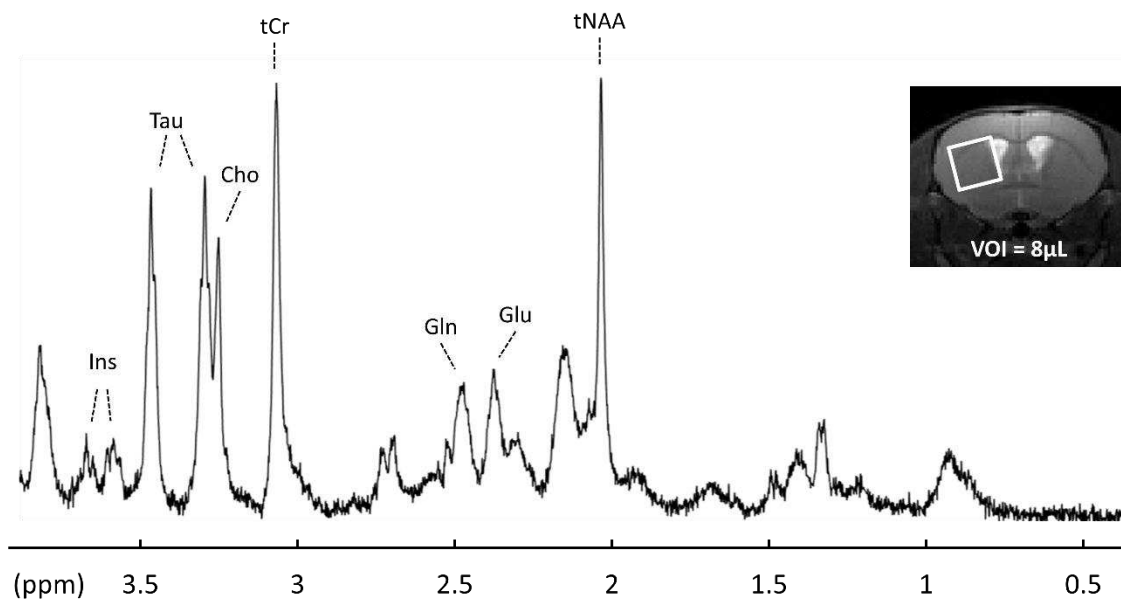


Figure II.6 : Exemple d'un spectre proton acquis à 11,7 T dans un voxel de 8 μ L placé autour du striatum chez la souris (image). On distingue aisément les principaux métabolites cérébraux (Inositol, Taurine, Choline, Créatine, Glutamine, Glutamate et N-Acétylaspartate).

N-Acétylaspartate et N-Acétylaspartylglutamate (tNAA) :

Le NAA est un des métabolites les plus présents dans le système nerveux central (≈ 7 mM). Son rôle n'est cependant pas encore totalement compris : plusieurs études ont néanmoins permis de localiser le NAA dans les cellules neuronales (Griffin and Mrak, 2002) faisant de ce métabolite un marqueur pertinent de la densité et de l'intégrité neuronale. L'observation des altérations de la concentration de NAA par SRM est donc communément utilisée pour témoigner de la souffrance des neurones en condition pathologique. En SRM, on parle en général de NAA total (tNAA) qui comprend le N-acétylaspartate (NAA) et le N-acétylaspartylglutamate (NAAG), indiscernables l'un de l'autre. Le pic principal du tNAA résonne à une fréquence relativement éloignée de celle de l'eau (2 ppm contre 4,7 ppm pour l'eau) ce qui rend la quantification de ce métabolite robuste même à bas champ (< 3 T) et facilite ainsi les applications cliniques.

Glutamate (Glu) :

Le glutamate est le neurotransmetteur le plus concentré dans le cerveau (≈ 8 mM). Cet acide aminé, dont le pic principal résonne à une fréquence de 2,35 ppm (il possède également des résonances à 2,05 ppm, 2,12 ppm et 3,75 ppm), est également plutôt localisé dans les neurones. On notera toutefois une présence en plus petite quantité dans les astrocytes (Griffin and Mrak, 2002) car le glutamate extracellulaire libéré dans la fente synaptique lors de la neurotransmission est recapté par les astrocytes. Le glutamate est ensuite converti en glutamine par la glutamine synthétase. Le Glu a un

rôle central dans le métabolisme énergétique et la concentration du glutamate doit être particulièrement bien régulée. En effet, un excès en glutamate extracellulaire peut engendrer une réaction excitotoxique qui est délétère pour les neurones. En conséquence, la concentration en glutamate peut se révéler être un marqueur pertinent du métabolisme énergétique et nombre de maladies neurodégénératives présentent des dérégulations très nettes de la concentration de glutamate. La quantification du glutamate à bas champ peut s'avérer compliquée en raison de la faible résolution spectrale qui rend parfois la discrimination du Glu et de la glutamine impossible.

Myo-Inositol (Ins) :

Le myo-inositol est rapporté comme étant majoritairement concentré dans le compartiment astrocytaire (environ 3 fois plus concentré que dans les autres cellules (Fisher et al., 2002). C'est d'ailleurs un osmolite du compartiment astrocytaire (Strange et al., 1994; Thurston et al., 1989). En cas de souffrance des neurones, on observe une augmentation de la concentration d'Ins. Ce changement résulte du phénomène d'activation astrocytaire qui est un corolaire des mécanismes de neuroprotection. L'observation des variations de concentrations d'Ins est donc régulièrement explorée pour la compréhension des maladies neurodégénératives. Les résonances de l'Ins se situent à 3,52 ppm et 3,61 ppm (Govindaraju et al., 2000).

Glutamine (Gln) :

La glutamine est également principalement concentrée dans les cellules astrocytaires et est considérée comme un marqueur potentiel de l'activation astrocytaire. La glutamine est synthétisée à partir du glutamate qui est recapté par les astrocytes dans l'espace extracellulaire. La glutamine étant une forme non neuro-active, elle permet d'assurer le recyclage du glutamate sans perturber le bon fonctionnement synaptique. Par conséquent, une dérégulation du cycle glutamate-glutamine peut être un marqueur du métabolisme cérébral. On observe en effet une hausse de la Gln dans de nombreux désordres neurologiques (Miller et al., 1993; Oz and Tkáč, 2011). L'augmentation de Gln n'est cependant pas toujours détectable du fait de sa résonance proche du glutamate (2,46 ppm) qui complexifie la quantification à faible résolution spectrale (bas champ).

Composés cholinergiques (tCho) :

La choline (Cho) ainsi que les autres composés cholinergiques tels que la phosphocholine (PCho), et de glycérophosphocholine (GPC) sont impliqués dans la synthèse de la membrane cellulaire et des neurotransmetteurs. Ces composés sont souvent réunis sous le terme de choline totale ou tCho. D'après Griffin et al. (2002), ce métabolite est principalement situé dans le compartiment astrocytaire mais en quantité modérée en comparaison de la Gln et de l'Ins. Des études sur des patients souffrant de troubles cognitifs ont également montré une augmentation, plus tardive, de Cho dans les zones touchées par la pathologie (Kantarci et al., 2000). Cette hausse peut être interprétée comme conséquence d'une dégradation plus importante de la membrane cellulaire incitant une production de Cho plus intense de manière à maintenir la membrane.

Créatine et phosphocréatine (tCr) :

La Créatine (Cr) est présente dans tous les types cellulaires du système nerveux. La concentration totale de Cr est considérée comme stable et sert donc très souvent de référence pour la normalisation des spectres RMN *in vivo*.

Taurine (Tau) :

La Tau semble concentrée dans l'ensemble du système nerveux. Son rôle n'est pas encore totalement compris : certaines hypothèses indiquent que ce métabolite aurait un rôle dans la régulation de l'excitotoxicité (El Idrissi and Trenkner, 2004)

II. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Grâce aux progrès technologiques (informatique, électronique) et du fait de leur caractère non invasif garantissant un suivi longitudinal du sujet, l'imagerie et la spectroscopie RMN se sont imposées comme des outils précieux au diagnostic et au suivi de l'évolution des pathologies, et tout particulièrement dans le cas maladies cérébrales.

Dérivée du principe de la RMN, l'IRM présente un intérêt clinique tout particulier pour des études médicales et particulièrement pour les applications au système nerveux central. Elle apporte en effet des informations structurelles telles que les changements de volume (atrophie, hypertrophie) d'une région cérébrale et peut également révéler de façon très précise la présence d'une tumeur ou d'un accident vasculaire cérébral. De plus, cette technique d'imagerie permet de générer une très grande diversité de contrastes grâce à la manipulation des paramètres d'acquisition. Le contraste IRM peut ainsi être sensible à la viscosité, l'inflammation ou l'organisation des tissus en profitant de la très bonne résolution spatiale de cette modalité d'imagerie.

A. Localisation du signal

Dans les paragraphes précédents, nous avons présenté les principes permettant de mesurer un signal RMN. Cependant, hormis pour la SRM localisée *in vivo* évoquée précédemment, le signal mesuré ne contient pas d'information spatiale mais provient de l'ensemble de l'échantillon en vue de l'antenne. Dans cette partie, nous présenterons succinctement les principes d'encodage de l'espace permettant d'acquérir des images en IRM.

Sous l'influence d'un champ magnétique homogène B_0 , tous les spins résonnent à la même fréquence $\omega_0 = -\gamma B_0$. L'objectif en imagerie est d'apporter une information spatiale aux signaux acquis. Par l'utilisation de bobines orientées le long des 3 directions cartésiennes (x, y, z), il est possible

de créer des variations de champ magnétiques linéaires en fonction de la position dans l'espace (**Figure II.7**).

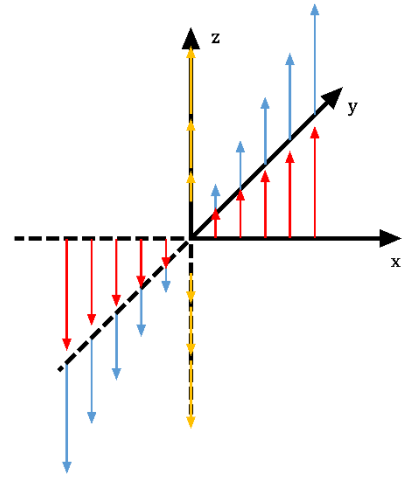
Figure II.7 : Orientation des gradients de champ magnétique dans l'espace.

Les gradients se définissent par :

$$G_x = \frac{\partial B_z}{\partial x}, \quad G_y = \frac{\partial B_z}{\partial y}, \quad G_z = \frac{\partial B_z}{\partial z}$$

Et sont exprimés en T/m ou en Hz/cm

(G_x en rouge, G_y en bleu et G_z en jaune).



Ces gradients de champ viennent donc s'ajouter au champ B_0 créant ainsi une dépendance de la valeur du champ total B à la position p d'un point dans l'espace :

$$B(p) = B_0 + G \cdot p \quad (\text{II.6})$$

Il en va de même pour la fréquence de résonance :

$$\omega(p) = -\gamma B(p) = -\gamma B_0 - \gamma G \cdot p \quad (\text{II.7})$$

Chacun des 3 gradients joue un rôle essentiel dans l'acquisition des images. Pour expliquer le fonctionnement et l'utilité de ces 3 gradients, nous nous placerons dans le cas de l'acquisition d'une image selon l'axe Oz à la position z_1 .

Tout d'abord, un premier gradient (appelé gradient de sélection de coupe) est appliqué durant la phase d'excitation de manière à n'exciter que les protons présents à la position z_1 . Ces protons auront donc une fréquence propre valant :

$$\omega_1 = \omega(z_1) = \omega_0 - \gamma G_z \cdot z_1 \quad (\text{II.8})$$

Par conséquent, pour rendre l'excitation sélective, l'impulsion RF devra être appliquée à la fréquence ω_1 (**Figure II.8**).

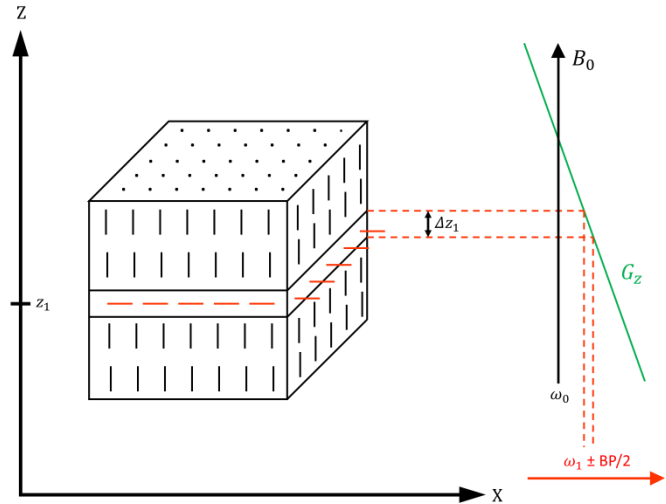
L'épaisseur de cette coupe Δz_1 est définie par la bande passante de l'impulsion RF et par la valeur du gradient (c'est-à-dire sa pente) :

$$\Delta z_1 = \frac{BP}{\gamma G_z} \quad (\text{II.9})$$

Ainsi, il est possible de diminuer l'épaisseur de coupe en réduisant la bande passante de la RF ou en augmentant la valeur du gradient.

Figure II.8 : Sélection d'une coupe d'épaisseur Δz_1 dans un volume.

Effectuée grâce à l'utilisation combinée d'une impulsion RF sélective de largeur de bande BP et d'un gradient de champ magnétique G_z .



Le profil spectral de l'impulsion de sélection de coupe est très important : l'impulsion RF doit être de forme rectangulaire pour que les spins soient excités de façon homogène. En théorie, pour obtenir une réponse fréquentielle rectangulaire, l'impulsion doit prendre la forme d'un sinus cardinal infini dans le domaine temporel. En pratique, il s'agit donc de trouver le bon compromis entre la modulation d'amplitude et la durée de l'impulsion.

Une fois les protons de la coupe correctement excités, le signal est ensuite encodé durant la précession grâce à l'action des gradients appliqués sur les directions Ox et Oy. Le signal ayant une évolution exponentielle complexe, il se définit par une fréquence et une phase.

L'échantillonnage vertical est effectué grâce à l'application du gradient de phase G_y qui va créer une dépendance spatiale de la phase du signal émis en fonction de sa position y :

$$\Phi(y, t) = -\gamma \int_0^{\tau} G_y y dt = -\gamma G_y y \tau \quad (\text{II.10})$$

Avec τ la durée d'application du gradient G_y .

L'utilisation du gradient de fréquence (ou gradient de lecture) G_x quant à lui permet de faire varier la fréquence de précession des spins en fonction de sa position horizontale x :

$$\omega(x) = \omega_0 - \gamma G_x \cdot x \quad (\text{II.11})$$

L'encodage en fréquence permettra donc de découper l'objet en colonnes suivant la direction horizontale Ox. Le gradient de lecture est appliqué en même temps que le signal RMN est enregistré.

Ainsi à chaque pas spatial (voxel) correspond une paire unique fréquence/phase (**Figure II.9**).

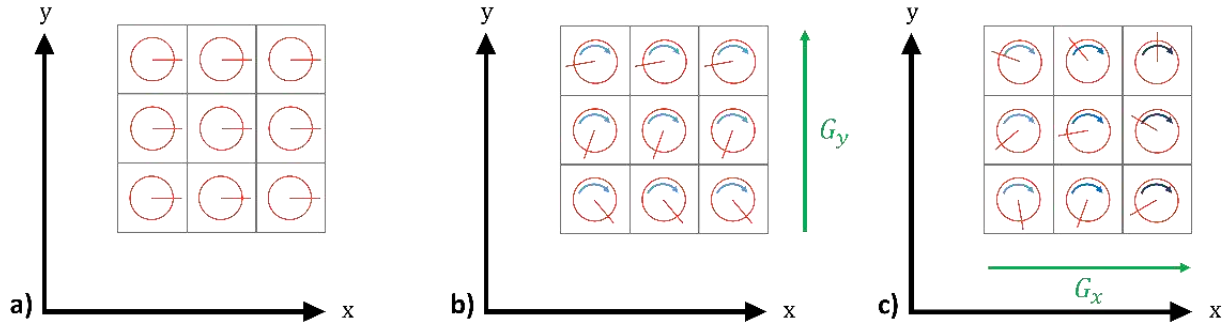


Figure II.9 : Encodage en phase et en fréquence du signal de la coupe à imager.

a) Orientation des spins après excitation de la coupe. **b)** Déphasage des spins en fonction de la position selon l'axe y après application du gradient de phase G_y . **c)** Variation de la fréquence de précession en fonction de la position selon l'axe x après application du gradient de fréquence G_x .

Le signal émis par l'objet peut donc être exprimé par l'équation suivante :

$$S(k_x(t), k_y(t)) = \iint \rho(x, y) \cdot e^{-i2\pi(k_x(t)x + k_y(t)y)} dx dy \quad (\text{II.12})$$

avec

$$k_x(t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G_x(\tau) d\tau$$

$$k_y(t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G_y(\tau) d\tau$$

et $\rho(x, y)$ correspondant à la distribution des spins.

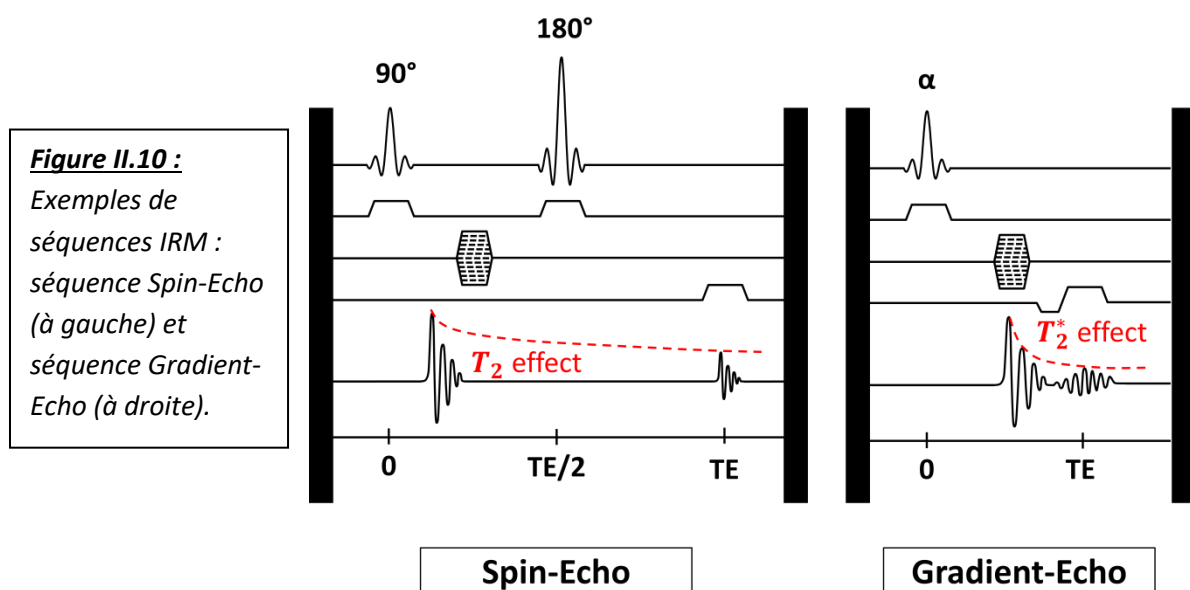
L'équation (II.11) représente en fait une expression mathématique de la transformée de Fourier à deux dimensions. A partir des coordonnées $(k_x(t), k_y(t))$, on peut donc construire un espace appelé espace k ou espace de Fourier dont la transformée de Fourier inverse correspond à l'image de la coupe à la position z_1 .

B. Notion de séquences IRM

Comme explicité précédemment, l'acquisition d'une image IRM se fait grâce à la manipulation de l'aimantation à l'aide d'impulsion radiofréquence et de gradients de champ magnétique pour localiser le signal dans l'espace. L'enchaînement de ces événements dans le temps définit la séquence d'acquisition. Une séquence de base se définit par le temps de répétition (TR) correspondant à la durée du module élémentaire de la séquence et le temps d'échos (TE) correspondant au temps séparant l'impulsion d'excitation et le milieu de l'écho. L'utilisation judicieuse de ces paramètres clés détermine les différentes origines du contraste IRM. Il existe une très grande diversité de séquence d'imagerie.

Néanmoins, on peut distinguer 2 grandes catégories de séquences IRM : les séquences dites Spin-Echos (SE) et Gradient-Echos (GRE), dont nous présentons le principe ci-après.

En général, une séquence SE est composée d'une impulsion à 90° permettant de basculer l'aimantation dans le plan transverse. Dès lors que l'impulsion RF n'est plus appliquée, on observe une décroissance rapide du signal due à l'effet T_2^* nommée « *Free Induction Decay* » ou *FID*. Cet effet de déphasage des spins, lié aux inhomogénéités de champ, reste néanmoins fixe au cours du temps. Par une simple inversion de l'orientation des spins, il est possible de créer un déphasage inverse de manière à annuler cet effet T_2^* : c'est l'écho de spin. Cette technique, découverte par Hahn (Hahn, 1950), entraîne donc une décroissance du signal uniquement liée à l'effet T_2 . En pratique, cette inversion est effectuée par le biais d'une seconde impulsion RF à 180° appliquée selon l'axe y (**Figure II.10**).



A la différence des séquences SE, les séquences GRE utilisent une excitation avec un petit angle de bascule, ce qui permet d'utiliser un TR faible qui diminue grandement le temps d'acquisition. Dans ce cas de figure, les spins sont remis en phase en appliquant un gradient inverse au gradient d'encodage en fréquence juste avant l'acquisition (**Figure II.10**). Cette séquence est donc bien plus rapide qu'une séquence SE mais, en contrepartie, le signal acquis sera de faible intensité. C'est pourquoi, d'ordinaire, lors d'une séquence GRE, on applique un angle de bascule α assez faible ($< 90^\circ$) de manière à garder une certaine aimantation longitudinale pour la répétition suivante. Cette séquence est donc extrêmement sensible aux effets T_2^* et par conséquent à la susceptibilité magnétique et aux inhomogénéités de champ car elle n'utilise pas d'écho de spin.

III. Applications aux maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies qui affectent progressivement la structure et/ou la fonction des cellules du système nerveux central ou périphérique. Ces atteintes cellulaires irréversibles conduisent au dysfonctionnement voire à la mort des neurones et créent ainsi des désordres cognitifs, psychiatriques ou moteurs chez le patient. Ces maladies, généralement conséquences du vieillissement, sont pour la plupart incurables en partie dû au fait que leur développement n'est pas encore complètement connu. Actuellement, la recherche médicale se concentre sur la recherche de biomarqueurs permettant de prévenir l'évolution de diverses maladies neurodégénératives. De par son aspect non-invasif de la technique, la pertinence des informations anatomiques et biologiques recueillies ainsi que sa facilité d'utilisation relative, l'IRM *in vivo*, et dans une moindre mesure la SRM, figurent parmi les méthodes de choix pour l'identification de biomarqueurs des maladies neurodégénératives. Bien évidemment, l'IRM n'est pas le premier examen réalisé pour détecter les maladies neurodégénératives chez les patients. En effet, c'est en général l'apparition de signes cliniques ou cognitifs qui oriente le médecin vers de telles maladies. L'IRM vient ensuite en support pour confirmer et raffiner le diagnostic initial.

Dans la maladie d'Alzheimer (MA) par exemple, l'utilisation de l'IRM permet notamment de distinguer la MA d'autres formes de démence pouvant provenir de l'apparition de tumeur ou d'hématomes mais également de localiser les structures les plus touchées par la pathologie. Les études du volume cérébral par IRM anatomique ont montré des variations de volumes spécifiques pour certaines régions du cerveau de patients Alzheimer. Ainsi, aux premiers stades de la maladie, on observe une atrophie du lobe temporal médian (Scahill et al., 2002) touchant tout d'abord le cortex entorhinal pour ensuite se propager à l'hippocampe et l'amygdale (Chan et al., 2001; Dickerson et al., 2001). Cette réduction de volume, majoritairement due à la mort neuronale (Jack et al., 2002), s'amplifie en fonction de l'avancement de la maladie : on estime par exemple que l'atrophie de l'hippocampe, structure impliquée dans des fonctions cognitives telles que la mémoire, évolue de 3 à 5% par an (Barnes et al., 2009). D'autres études rapportent également une atrophie du corps calleux (Hempel et al., 1998; Lyoo et al., 1997) qui peut être corrélée à une défaillance de fonctions neuropsychologiques contribuant au développement de la démence chez les patients Alzheimer.

L'IRM anatomique permet également d'identifier des structures particulièrement vulnérables dans la maladie de Huntington. Ainsi, on peut observer une atrophie du striatum comprenant le putamen et le noyau caudé (Harris, 1992 & 1996). La diminution du volume striatal commence dès les stades précoces de la maladie (Rosas et al., 2003) et est corrélée à la longueur de la répétition de CAG et la durée depuis laquelle les symptômes sont déclarés (Paulsen et al., 2008; Tabrizi et al., 2012), ce qui en fait un biomarqueur pertinent pour caractériser l'évolution de la pathologie. Une réduction du volume du cortex, progressant avec la maladie, est également rapportée chez les patients Huntington (Rosas et al., 2008), tout comme l'altération de la substance blanche autour du striatum et dans le corps calleux (Hobbs et al., 2010; Tabrizi et al., 2013) qui pourrait être à la source des problèmes de coordination de mouvements.

L'application de la SRM dans la maladie d'Alzheimer a montré une diminution globale du rapport NAA/Cr dans le cerveau de patient et plus particulièrement dans le lobe temporal et le gyrus cingulaire (Kantarci et al., 2000). La baisse du NAA, marqueur de la densité neuronale, est donc mesurée dans la

même structure que l'atrophie ce qui illustre bien la neurodégénérescence liée à la MA. Les patients Alzheimer présentent également une augmentation de myo-inositol probablement due à la prolifération des cellules gliales et à leur activation dans le but de lutter contre la dégradation des neurones. Cette augmentation apparaît généralement aux stades précoces de la maladie alors que l'augmentation de NAA ne se manifeste qu'aux plus stades avancés de la maladie (Kantarci, 2007). On peut également noter que l'augmentation des dépôts de plaques A β est corrélée avec la diminution des concentrations de NAA et de glutamate (von Kienlin et al., 2005). On peut aussi mesurer une hausse de la quantité de choline dans le cerveau des patients atteints de la MA (Jessen et al., 2000; Schuff et al., 1998). Cette augmentation est traditionnellement associée à une recrudescence du renouvellement des membranes cellulaires en raison des défauts de métabolisme de l'acétylcholine (Wurtman et al., 1985). Certaines études ne montrent cependant aucun changement de la concentration de choline dans la MA (Krishnan, 2003; Schuff et al., 1998). En comparant avec des patients atteints de déficience cognitives légères, Kantarci et al. (2007) ont déterminé que l'augmentation de choline n'avait pas lieu si les capacités cognitives restent stables. En conclusion, la hausse de choline semble liée au stade de développement de la maladie.

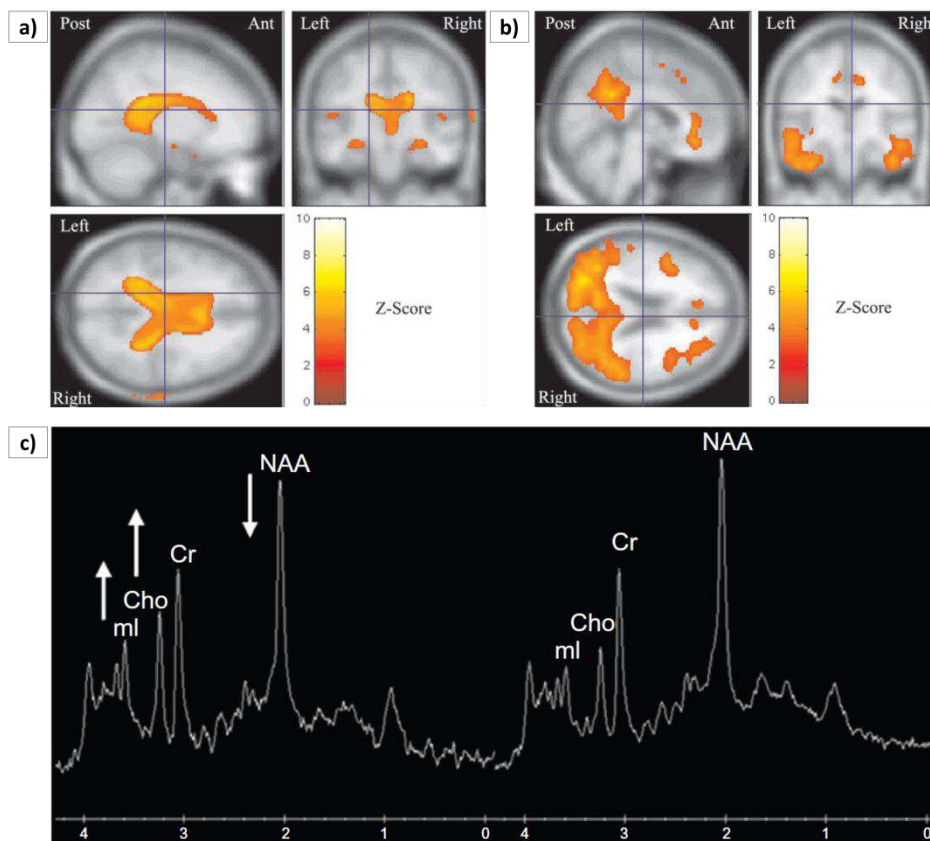


Figure II.11 : Cartes paramétriques IRM et spectre (^1H) de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer.

- Carte paramétrique attestant des augmentations de volume (ventricules). (*Scahill et al., 2001*)
- Carte paramétrique de réductions de volume (hippocampe, lobe temporal, gyrus cingulaire). (*Scahill et al., 2001*)
- Spectre protonique acquis dans le cortex montrant une augmentation de myo-inositol et de Choline ainsi qu'une diminution de NAA chez le patient Alzheimer (à gauche) comparé au patient non atteint (à droite). (*Graff-Radford & Kantarci, 2013*)

Les études de spectroscopie RMN du proton sur des patients Huntington ont montré une baisse du NAA ainsi qu'une augmentation de lactate dans le striatum et le cortex (Jenkins et al., 2002). L'application de la SRM a également montré une hausse du niveau de myo-inositol au stades précoces de la maladie qui correspond certainement à une réaction des cellules gliales à la souffrance des neurones (Sturrock et al., 2015).

Les exemples d'utilisation « conventionnelle » de l'IRM et de la SRM permettent de mettre en évidence l'intérêt clinique de ces méthodes non-invasives. L'IRM permet de mesurer précisément les atteintes macroscopiques des structures du cerveau qui sont probablement le reflet à long terme d'événements biologiques ayant eu lieu plusieurs années avant la dégénérescence des cellules cérébrales. Cependant, bien que très informatif, ce suivi « anatomique » de la maladie apporte finalement assez peu d'informations sur l'origine biologique de la pathologie.

En SRM en revanche, la mesure permet d'accéder à des informations biologiques primordiales à la compréhension du métabolisme cérébral. Cependant, la limitation majeure de cette technique reste sa faible sensibilité qui nécessite l'acquisition de spectres dans des volumes relativement importants. Ainsi, les événements précoces ayant lieu à priori dans de petites zones du cerveau sont difficilement détectables par cette méthode.

On comprend donc qu'il existe un fossé entre information biologique et information spatiale qu'il serait important de pouvoir combler pour compléter la palette d'outils pour le suivi des maladies neurodégénératives. C'est dans ce contexte que le développement de l'imagerie métabolique par IRM de transfert d'aimantation, ou IRM-CEST pour *Chemical Exchange Saturation Transfer*, trouve son origine et peut s'avérer particulièrement pertinente. Cette technique d'imagerie constitue le cœur de cette thèse. Dans les chapitres suivants, nous présentons les principes physiques expliquant l'origine de ce contraste, les développements méthodologiques réalisées en IRM-CEST ainsi que l'utilisation de cette technique d'imagerie comme biomarqueur pertinent de la maladie de Huntington.

Chapitre III : Imagerie CEST

(Transfert de Saturation par Echange Chimique)

I. Historique de l'imagerie CEST

Dans la plupart des échantillons, et particulièrement dans les systèmes biologiques, les échanges entre différentes espèces chimiques jouent un rôle majeur. En effet, bon nombre de réactions reposent sur des interactions moléculaires ou des échanges au niveau atomique. De plus, la dynamique de ces échanges peut contenir des informations précieuses reflétant notamment les propriétés physico-chimiques du milieu considéré. Lorsque deux populations d'atomes sont en échange, deux états ou plus coexistent au sein du système ce qui a pour conséquence de faire varier l'environnement électronique des atomes en fonction de leur position. La RMN s'est révélée être un outil de choix pour l'étude des échanges chimiques et reste encore actuellement un domaine de recherche très actif.

Dès 1951, Liddel & Ramsey et Arnold & Packard observent pour la première fois les effets des échanges chimiques sur un spectre RMN (Arnold et al., 1951; Liddel and Ramsey, 1951). Plus tard, en 1958, Harden McConnell parvient à formaliser l'évolution de l'aimantation lorsqu'il y a échanges de protons entre deux espèces chimiques en modifiant les équations de Bloch (McConnell, 1958). A partir de ces découvertes, Forsen & Hoffman développent la spectroscopie de transfert d'aimantation et l'appliquent en 1963 pour l'observation du transfert de saturation lié aux échanges de fonctions hydroxyles -OH entre le salicylaldehyde et le 2-hydroxyacetophenone (**Figure III.1**) (Forsén and Hoffman, 1963).

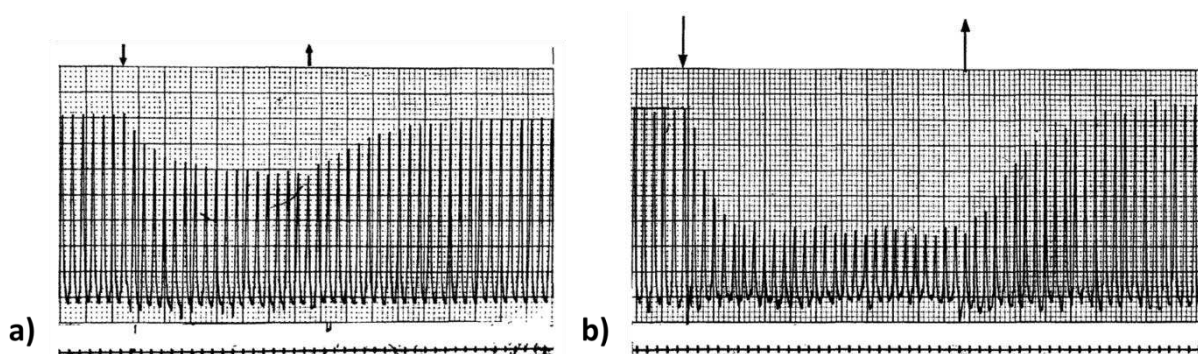


Figure III.1 : Evolution temporelle de la saturation lors des expériences de Forsen & Hoffman (1963).

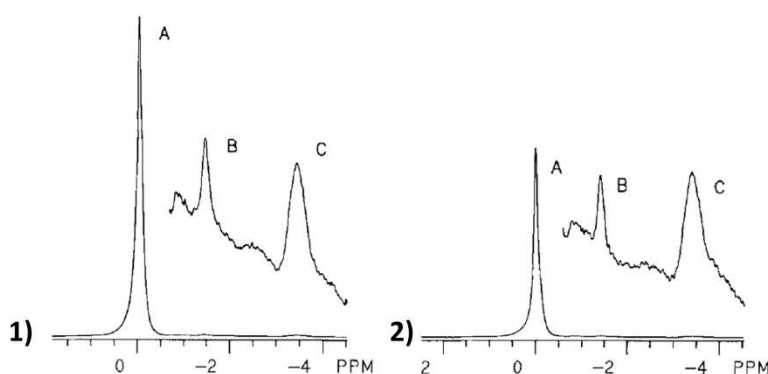
La flèche pointant vers le bas représente le moment où l'impulsion de saturation est appliquée et la flèche pointant vers le haut, le moment où l'impulsion de saturation est stoppée. **a)** Transfert de saturation pour le salicylaldehyde. **b)** Transfert de saturation pour le 2-hydroxyacetophenone.

Cette technique sera ensuite adaptée à l'IRM *in vivo* à la fin du 20^e siècle par Wolff & Balaban (1989) pour observer le transfert d'aimantation entre l'eau libre et les macromolécules présentes dans le rein et le muscle squelettique du lapin (Wolff and Balaban, 1989). Ils remarquent que l'application d'une impulsion de saturation à la fréquence de résonance du métabolite d'intérêt (ici la triméthylamine) provoque une diminution du signal de l'eau libre qui est mesurable (**Figure III.2**).

Figure III.2 : Effet de la saturation sur les signaux de l'eau et des métabolites détectés dans le rein de lapin (Wolff & Balaban, 1989).

Les pics détectés correspondent à l'eau (A), la triméthylamine (B) et aux lipides (C).

1. Spectre sans saturation
2. Spectre avec saturation, diminution du signal de l'eau.



Cette réduction du signal est issue d'un transfert de saturation entre les deux groupes de protons en échange chimique d'où l'appellation de ce nouveau mécanisme de contraste : CEST pour *Chemical Exchange dependent Saturation Transfer*. Depuis 1999 et les travaux pionniers utilisant ce mode de contraste pour l'imagerie (Ward and Balaban, 2000), la méthode CEST n'a cessé de se développer permettant désormais de détecter avec une grande sensibilité des macromolécules (Snoussi et al., 2003), des métabolites endogènes (Zhou et al., 2003; van Zijl et al., 2007), des agents exogènes permettant d'avoir accès aux variations de pH et de température (Aime et al., 2002; Zhang et al., 2013) ou encore d'autres agents de contraste CEST plus complexes (Aime et al., 2005; McMahon et al., 2008; Schröder et al., 2006; Zhao et al., 2008).

Dans ce chapitre, nous présenterons les principes physiques à l'origine du contraste CEST. Une revue bibliographique plus complète des différentes modalités d'imagerie CEST sera abordée dans le chapitre **IV** de ce manuscrit.

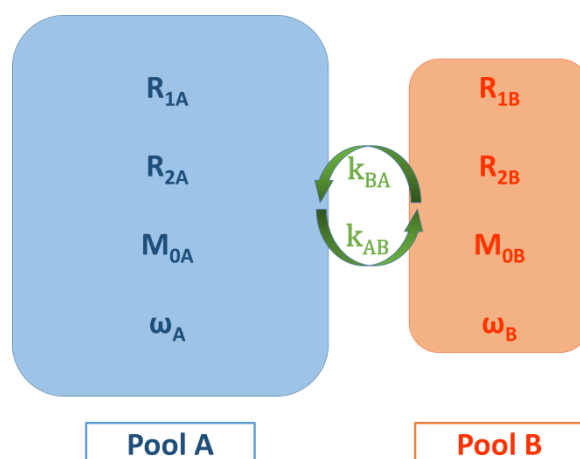
II. Description de l'effet CEST

A. Principe général

Le principe général du CEST repose, comme le désigne son acronyme, sur l'observation du transfert de saturation entre deux ou plusieurs groupes de protons en échange. Afin de décrire le cadre théorique régissant les principes de l'imagerie CEST, considérons un système comportant deux groupes de protons distincts du point de vue de leur environnement électronique. Ces deux groupes de protons A et B, représentant respectivement les protons de l'eau libre (solvant), qui correspondent aux protons effectivement observés en IRM, et les protons labiles du soluté, généralement non observables en raison de leur trop faible concentration. Ces deux groupes de protons sont caractérisés par leur aimantation (M_{0A} et M_{0B} qui sont respectivement proportionnelles à la concentration de chaque groupe), leur taux de relaxation longitudinale (R_{1A} et R_{1B}) et transversale (R_{2A} et R_{2B}) ainsi que par leur fréquence de résonance propre (ω_A et ω_B). De plus, les deux populations sont en échange constant avec des taux d'échange notés k_{AB} pour le transfert de protons du pool A vers le pool B et k_{BA} pour le transfert inverse (**Figure III.3**).

Figure III.3 : Modèle de transfert de saturation à deux compartiments.

Le pool A correspond à l'eau libre et le pool B à l'agent CEST en échange constant avec l'eau libre. Les taux d'échanges k_{AB} et k_{BA} définissent les transferts des protons entre les pools A et B. Chaque compartiment est défini par ses taux de relaxation longitudinale et transversale (R_1 et R_2), son aimantation (M_0) et sa fréquence de résonance (ω).



Afin de comprendre le principe de l'effet CEST, reprenons l'exemple du système à deux groupes de protons en échange (**Figure III.4a**). Même si en pratique il est impossible en IRM de mesurer l'aimantation propre des protons du soluté du fait de leur faible concentration, nous représentons leur signal pour l'illustration. Dans une expérience CEST, une impulsion RF est appliquée à la fréquence de résonance des protons labiles du soluté (**Figure III.4b**). L'impulsion de saturation fréquentiellement sélective va déphaser l'aimantation des protons du soluté et donc détruire leur signal. Les protons ainsi saturés sont représentés en rouge sur la **figure III.4**. Étant donné que l'échange chimique est constant, une partie de la saturation va être transférée du soluté vers le solvant, entraînant par conséquent une diminution du signal RMN de l'eau libre (**Figure III.4c**). On comprend donc que l'application d'une saturation sélective permet de détecter de façon indirecte la présence du soluté via la baisse du signal de l'eau libre due à un transfert de la saturation d'un groupe de proton à l'autre.

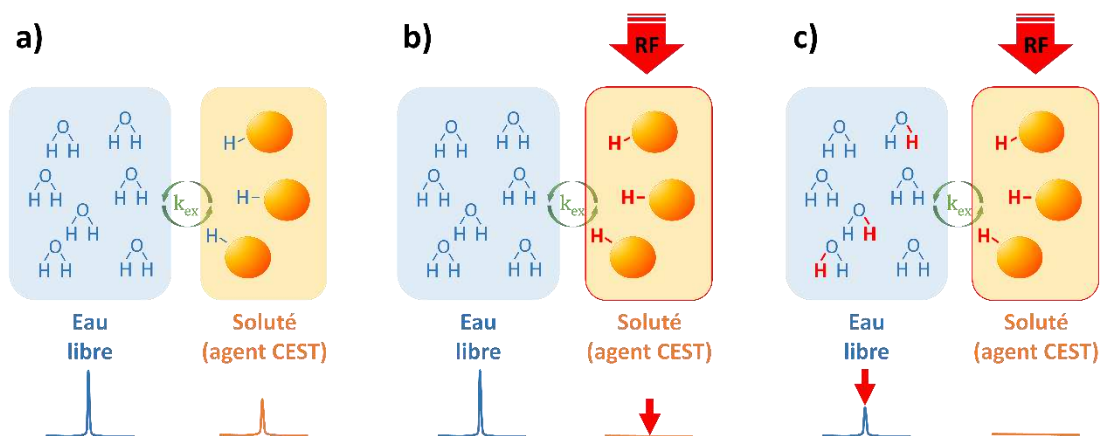


Figure III.4 : Description du principe de l'effet CEST.

- Système à l'état initial : aucune saturation n'est appliquée.
- Saturation appliquée à la fréquence de résonance des protons de l'agent CEST. Le signal RMN des protons du soluté diminue jusqu'à devenir nul (flèche rouge).
- Transfert des protons saturés (représentés en rouge) à l'eau libre résultant sur une réduction du signal RMN de l'eau (flèche rouge)

B. Condition d'observation de l'effet CEST

Comme énoncé précédemment dans le chapitre II, les équations de Bloch permettent de caractériser les phénomènes de transfert d'aimantation (Bloch, 1946) et peuvent être adaptées afin de décrire les transferts de saturation. Le transfert de saturation peut se réaliser selon plusieurs cas : un couplage dipolaire entre macromolécules entraînant un effet sur la relaxation (effet Overhauser nucléaire ou NOE) et le cas de molécules en échange chimique. Grâce au travail de deux scientifiques, les équations de Bloch ont pu être modifiées de manière à expliquer ces différents processus. Solomon parvint à décrire les interactions dipôle-dipôle incluant donc l'effet NOE en 1955 (Solomon, 1955), tandis que McConnell réussit en 1958 à définir l'évolution de l'aimantation en présence d'échanges chimiques. Nous nous concentrons ici sur l'effet CEST, par conséquent, seules les équations de Bloch-McConnell seront décrites.

En se plaçant dans le cas du modèle présenté précédemment (**Figure III.3**), si on applique une impulsion RF selon l'axe Ox, les équations de Bloch-McConnell peuvent s'écrire de la façon suivante :

$$\frac{dM_{xA}}{dt} = -\Delta\omega_A M_{yA} - (R_{2A} + k_{AB})M_{xA} + k_{BA}M_{xB} \quad (\text{III.1})$$

$$\frac{dM_{yA}}{dt} = \Delta\omega_A M_{xA} - (R_{2A} + k_{AB})M_{yA} + \omega_1 M_{zA} + k_{BA}M_{yB} \quad (\text{III.2})$$

$$\frac{dM_{zA}}{dt} = -\omega_1 M_{yA} - R_{1A}(M_{zA} - M_{0A}) - k_{AB}M_{zA} + k_{BA}M_{zB} \quad (\text{III.3})$$

$$\frac{dM_{xB}}{dt} = k_{AB}M_{xA} - (R_{2B} + k_{BA})M_{xB} - \Delta\omega_B M_{yB} \quad (\text{III.4})$$

$$\frac{dM_{yB}}{dt} = k_{AB}M_{yA} + \omega_B M_{xB} - (R_{2A} + k_{BA})M_{yB} + \omega_1 M_{zB} \quad (\text{III.5})$$

$$\frac{dM_{zB}}{dt} = -k_{AB}M_{zA} - \omega_1 M_{yB} - R_{1B}(M_{zB} - M_{0B}) + k_{BA}M_{zB} \quad (\text{III.6})$$

avec :

M_{xA}, M_{yA}, M_{zA} et M_{xB}, M_{yB}, M_{zB} , les aimantations dans le référentiel tournant,

M_{0A} et M_{0B} , les aimantations à l'équilibre (colinéaires au champ B_0 selon l'axe Oz),

$R_{1A} = 1 / T_{1A}$ et $R_{1B} = 1 / T_{1B}$, les taux de relaxation longitudinale,

$R_{2A} = 1 / T_{2A}$ et $R_{2B} = 1 / T_{2B}$, les taux de relaxation transversale,

$\Delta\omega_A$ et $\Delta\omega_B$, les différences entre la fréquence de Larmor des pools et la fréquence d'application de la RF,

k_{AB} et k_{BA} , les taux d'échange du pool A au pool B et inversement et

$\omega_1 = \gamma B_1$, l'amplitude de l'onde RF.

Considérons maintenant que cet équilibre est perturbé par l'application d'une impulsion d'excitation non sélective fréquentiellement. Ainsi, les aimantations des deux populations de spins A et B sont basculées dans le plan transverse (dans le cas d'une impulsion de 90°).

A $t = 0$, l'aimantation de chaque pool est décrite par :

$$M_A = \begin{pmatrix} 0 \\ M_{0A} \\ 0 \end{pmatrix} \text{ et } M_B = \begin{pmatrix} 0 \\ M_{0B} \\ 0 \end{pmatrix}$$

Ainsi, après application de la perturbation, l'évolution des aimantations dans le plan transverse sera définie par les équations suivantes :

$$\frac{dM_{xA}}{dt} = -\Delta\omega_A M_{yA} - (R_{2A} + k_{AB})M_{xA} + k_{BA}M_{xB} \quad (\text{III.7})$$

$$\frac{dM_{yA}}{dt} = \Delta\omega_A M_{xA} - (R_{2A} + k_{AB})M_{yA} + \omega_1 M_{zA} + k_{BA}M_{yB} \quad (\text{III.8})$$

$$\frac{dM_{xB}}{dt} = k_{AB}M_{xA} - (R_{2B} + k_{BA})M_{xB} - \Delta\omega_B M_{yB} \quad (\text{III.9})$$

$$\frac{dM_{yB}}{dt} = k_{AB}M_{yA} + \omega_B M_{xB} - (R_{2A} + k_{BA})M_{yB} \quad (\text{III.10})$$

On peut donc réécrire ce système sous forme matricielle en considérant les aimantations transversales complexes : $M_{TA} = M_{yA} - iM_{xA}$ et $M_{TB} = M_{yB} - iM_{xB}$

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_{TA} \\ M_{TB} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} i\Delta\omega_A - (R_{2A} + k_{AB}) & k_{BA} \\ k_{AB} & i\Delta\omega_B - (R_{2B} + k_{BA}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_{TA} \\ M_{TB} \end{pmatrix} \quad (\text{III.11})$$

De ce système, on déduit les solutions analytiques suivantes, caractérisant l'évolution temporelle des aimantations transversales en présence d'échange chimique :

$$M_{TA}(t) = c_{1A} \cdot e^{\lambda_1 t} + c_{2A} \cdot e^{\lambda_2 t} \quad (\text{III.12})$$

$$M_{TB}(t) = c_{1B} \cdot e^{\lambda_1 t} + c_{2B} \cdot e^{\lambda_2 t} \quad (\text{III.13})$$

avec λ_1 et λ_2 les valeurs propres de la matrice.

Dans le but de simplifier l'expression de ces solutions, considérons le cas particulier où $M_{0A} = M_{0B}$. A l'équilibre, les flux de protons entre les deux pools étant égaux, on a : $k_{AB} = k_{BA}$ et par conséquent, $k_{AB} \cdot M_{0A} = k_{BA} \cdot M_{0B}$. Il est donc possible, en négligeant les relaxations transverses, de déterminer les valeurs des solutions analytiques :

$$\lambda_1 = i \left(\frac{\Delta\omega_A + \Delta\omega_B}{2} \right) - k_{AB} + W$$

$$\lambda_2 = i \left(\frac{\Delta\omega_A + \Delta\omega_B}{2} \right) - k_{AB} - W$$

$$c_{1A} = \frac{M_{0A}}{2W} \left(i \left(\frac{\Delta\omega_A - \Delta\omega_B}{2} \right) + k_{AB} + W \right), \quad c_{2A} = \frac{M_{0A}}{2W} \left(-i \left(\frac{\Delta\omega_A - \Delta\omega_B}{2} \right) + k_{AB} + W \right)$$

$$c_{1B} = \frac{M_{0B}}{2W} \left(i \left(\frac{\Delta\omega_A - \Delta\omega_B}{2} \right) + k_{AB} + W \right), \quad c_{2B} = \frac{M_{0B}}{2W} \left(-i \left(\frac{\Delta\omega_A - \Delta\omega_B}{2} \right) + k_{AB} + W \right)$$

avec $W = \sqrt{(k_{AB})^2 - \left(\frac{\Delta\omega_A - \Delta\omega_B}{2}\right)^2}$.

Ainsi, le signal mesuré sera équivalent à la somme des aimantations transversales de chaque population de protons : $M_{TA}(t) + M_{TB}(t)$.

Pour mieux comprendre les effets de l'échange chimique sur l'observation des différents groupes de protons, considérons deux régimes d'échanges : les échanges lents et les échanges rapides.

Echange lent :

En cas d'échange lent entre les deux groupes de protons, c'est-à-dire lorsque $k_{AB} \ll |\Delta\omega_A - \Delta\omega_B|$, les différents termes des solutions analytiques peuvent être simplifiés de la façon suivante :

$$W \approx \frac{\Delta\omega_A - \Delta\omega_B}{2}, \quad \lambda_1 \approx i\Delta\omega_A - k_{AB}, \quad \lambda_2 \approx i\Delta\omega_B - k_{AB},$$

$$c_{1A} \approx M_{0A}, \quad c_{1B} \approx M_{0B}, \quad c_{2A} \approx c_{2B} \approx 0.$$

A partir de ces estimations, on en déduit le signal :

$$S(t) = M_{TA}(t) + M_{TB}(t) = M_{0A}e^{(i\Delta\omega_A - k_{AB})t} + M_{0B}e^{(i\Delta\omega_B - k_{AB})t} \quad (\text{III.14})$$

La transformée de Fourier de ce signal correspond à un spectre à deux pics d'intensités M_{0A} et M_{0B} centrés en $\Delta\omega_A$ et $\Delta\omega_B$ et de largeur à mi-hauteur de $2k_{AB}$ (**Figure III.5**).

Echange rapide :

Lorsque l'échange entre les deux groupes de protons est rapide, c'est-à-dire lorsque $k_{AB} \gg |\Delta\omega_A - \Delta\omega_B|$, les solutions analytiques deviennent :

$$W \approx k_{AB} \left(1 - \frac{(\Delta\omega_A - \Delta\omega_B)^2}{8(k_{AB})^2} \right),$$

$$\lambda_1 \approx i \frac{(\Delta\omega_A - k_{AB})}{2} - k_{AB} + W, \quad \lambda_2 \approx i \frac{(\Delta\omega_A - k_{AB})}{2} - k_{AB} - W,$$

$$c_{1A} \approx M_{0A}, \quad c_{1B} \approx M_{0B}, \quad c_{2A} \approx c_{2B} \approx 0.$$

Le signal mesuré sera donc défini par :

$$S(t) = M_{TA}(t) + M_{TB}(t) = M_{0A}e^{\left(\frac{i(\Delta\omega_A - k_{AB})}{2} - \frac{(\Delta\omega_A - \Delta\omega_B)^2}{8k_{AB}}\right)t} + M_{0B}e^{\left(\frac{i(\Delta\omega_A - k_{AB})}{2} + \frac{(\Delta\omega_A - \Delta\omega_B)^2}{8k_{AB}}\right)t} \quad (\text{III.15})$$

Le spectre observé ne sera constitué que d'un seul pic d'intensité $M_{0A} + M_{0B}$, centré en $\frac{\Delta\omega_A + \Delta\omega_B}{2}$ et de largeur à mi-hauteur d'une valeur de $\frac{(\Delta\omega_A - \Delta\omega_B)^2}{4(k_{AB})^2}$.

Le transfert d'aimantation n'étant possible qu'entre deux populations de protons fréquemment distinctes, on comprend qu'il existe une condition d'observation de l'effet CEST dépendant de la différence entre les déplacements chimiques entre les deux groupes et du taux d'échange entre les deux groupes de protons telle que :

$$k_{AB} \ll |\Delta\omega_A - \Delta\omega_B| \quad (\text{III.16})$$

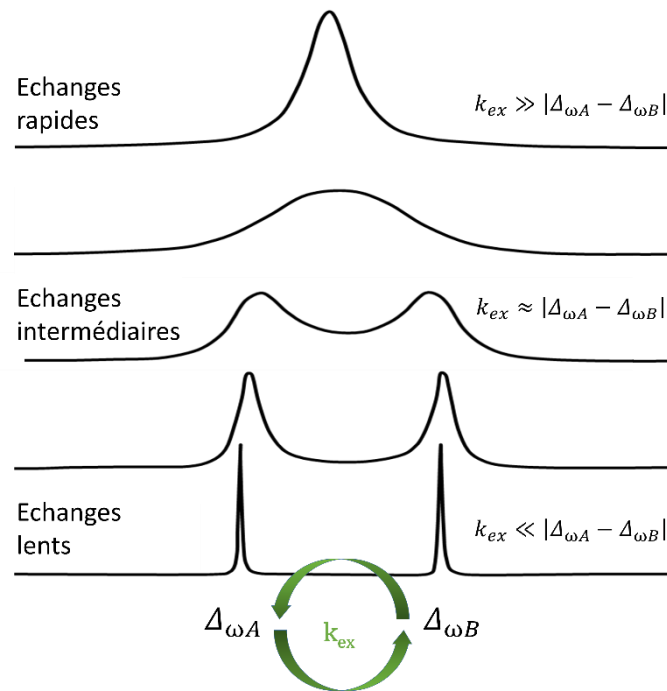


Figure III.6 : Détection des différentes populations de protons en fonction du régime d'échange.

C. Transfert de saturation

Supposons maintenant que l'application d'une impulsion sature sélectivement les protons du pool B sans affecter les protons du pool A. A partir de cette hypothèse, nous pouvons considérer trois cas : la saturation complète, partielle et faible des protons du pool B.

1. Saturation complète des protons du pool B

Dans cette situation, l'aimantation du système évoluera comme décrit par les équations de Bloch-McConnell jusqu'à ce que le flux de transfert soit nul : c'est-à-dire jusqu'à atteindre un état d'équilibre où le nombre de protons échangés par chaque pool est identique.

Lorsqu'on accède à l'état d'équilibre, l'aimantation du pool B devient nulle : $M_{xB} = M_{yB} = M_{zB} = 0$ entraînant une simplification des équations précédentes par la suppression de toutes les dépendances temporelles. A partir de ces hypothèses, nous pouvons donc obtenir une solution simple de la résolution des équations de Bloch-McConnell :

$$\frac{M_{zA}(t)}{M_{0A}} = \frac{R_{1A}}{R_{1A} + k_{AB}} + \left(1 - \frac{R_{1A}}{R_{1A} + k_{AB}}\right) e^{-(R_{1A} + k_{AB})t} \quad (\text{III.17})$$

Nous pouvons également en déduire une valeur simple du rapport de transfert de protons (PTR : *Proton Transfer Ratio*), aussi appelé taux de saturation, pour une saturation complète :

$$PTR = 1 - \frac{M_{zA}}{M_{0A}} = \frac{M_{0A} - M_{zA}}{M_{0A}} = \frac{k_{AB}}{R_{1A} + k_{AB}} \quad (\text{III.18})$$

On constate d'après l'équation III.18 que l'efficacité du transfert d'aimantation, représentée par le PTR, va dépendre du temps de relaxation longitudinale des protons A ainsi que du taux d'échange entre les protons A et B. Il existe donc une sorte d'équilibre entre l'aimantation restaurée par le recouvrement du signal par repousse de l'aimantation longitudinale et la destruction du signal par le transfert d'aimantation via l'échange chimique avec les protons B.

2. Saturation partielle des protons du pool B

En pratique, la saturation complète n'est jamais atteinte car cela implique d'utiliser une longue irradiation d'une durée d'au moins de $5 T_{1B}$. Or une exposition trop longue, en plus d'être éprouvante pour les composants électroniques du scanner IRM, augmente la puissance délivrée aux patients (mesurable grâce au débit d'absorption spécifique (DAS)) et peut poser des problèmes de sécurité, spécialement à haut champ.

Dixon et al. (2010) ont néanmoins prouvé que, pour augmenter l'efficacité de détection des agents CEST tout en diminuant le DAS, l'utilisation d'un train d'impulsions s'avère être une alternative efficace à l'emploi d'une onde d'irradiation continue. Ce type de schéma de saturation complique toutefois les équations de Bloch-McConnell (Dixon et al., 2010; Sun and Sorensen, 2008; Zu et al., 2011).

Pour ce cas de figure, la saturation des spins B est incomplète. Le système d'équation de Bloch-McConnell, en négligeant les termes d'évolution fréquentielle, devient alors :

$$\frac{dM_{yA}}{dt} = R_{2A}M_{yA} - k_{AB}M_{yA} + k_{BA}M_{yB} \quad (\text{III.19})$$

$$\frac{dM_{zA}}{dt} = -R_{1A}(M_{zA} - M_{0A}) - k_{AB}M_{zA} + k_{BA}M_{zB} \quad (\text{III.20})$$

$$\frac{dM_{yB}}{dt} = -R_{2A}M_{yB} - k_{BA}M_{yB} + k_{AB}M_{yA} - \omega_1 M_{zB} \quad (\text{III.21})$$

$$\frac{dM_{zB}}{dt} = -R_{1B}(M_{zB} - M_{0B}) + k_{AB}M_{zA} - k_{BA}M_{zB} + \omega_1 M_{yB} \quad (\text{III.22})$$

A l'équilibre, les dérivées temporelles s'annulent et on peut donc résoudre le système :

$$M_{zB} - M_{0B} = \frac{\omega_1^2 M_{0B}}{\omega_1^2 + pq} \quad (\text{III.23})$$

$$M_{yB} = \frac{\omega_1 q M_{0B}}{\omega_1^2 + pq} \quad (\text{III.24})$$

$$M_{zB} - M_{0B} = \frac{\omega_1^2 M_{0B}}{\omega_1^2 + pq} \quad (\text{III.25})$$

$$M_{yB} = \frac{\omega_1 q M_{0B}}{\omega_1^2 + pq} \quad (\text{III.26})$$

avec

$$p = R_{2B} + k_{BA} - \frac{k_{AB}k_{BA}}{R_{2A} + k_{AB}} \quad \text{et} \quad q = R_{1B} + k_{BA} - \frac{k_{AB}k_{BA}}{R_{1A} + k_{AB}}.$$

Si on applique la saturation pendant un temps suffisamment long de façon à atteindre une saturation complète des protons du soluté, le PTR vaut alors :

$$PTR(\Delta_{\omega B}) = \frac{k_{AB}}{R_{1A} + k_{AB}} \frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + pq + \frac{p}{q} \Delta_{\omega B}^2} \quad (\text{III.27})$$

On peut ensuite en déduire le ratio de saturation α du pool B :

$$\alpha(\Delta_{\omega B}) = \frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + pq + \frac{p}{q} \Delta_{\omega B}^2} \quad (\text{III.28})$$

3. Approximation de saturation faible

Dans cette situation, l'aimantation des protons du soluté après saturation, retrouvera son état d'équilibre quasiment instantanément n'entraînant que peu d'effets sur le signal de l'eau libre. On peut ainsi approximer l'aimantation de l'eau libre ($M_{ZA}(0) = M_{0A}$) et en dériver le transfert de proton en fonction du temps de saturation t_{sat} :

$$PTR(t_{sat}) = \frac{\alpha \cdot k_{AB}}{R_{1A} + k_{AB}} (1 - e^{-t_{sat}(R_{1A} + k_{AB})}) \quad (\text{III.29})$$

Sachant que pour respecter les flux d'aimantation entre les deux groupes de protons les taux d'échange doivent respecter la condition suivante :

$$k_{AB}M_{zB} = k_{BA}M_{zA} \leftrightarrow k_{AB} = k_{BA} \frac{M_{zA}}{M_{zB}} \quad (\text{III.30})$$

On peut donc exprimer le PTR en fonction du temps de saturation et des aimantations M_{ZA} et M_{zB} des deux pools :

$$PTR(t_{sat}) = \frac{\alpha \cdot k_{BA}}{R_{1A} + k_{AB}} \frac{M_{zB}}{M_{zA}} (1 - e^{-t_{sat}(R_{1A} + k_{AB})}) \quad (\text{III.31})$$

Ainsi, le PTR, et donc l'effet CEST, dépend à la fois de la durée d'application d'impulsion RF (t_{sat}), du temps de relaxation longitudinal ($\frac{1}{R_{1A}}$), du rapport $\frac{M_{ZB}}{M_{ZA}}$ proportionnel au rapport des concentrations de protons ($\frac{[soluté]}{[eau\ libre]}$), du taux d'échanges k_{BA} et enfin de l'amplitude de l'impulsion (ω_1) qui est un paramètre primordial concernant l'efficacité de saturation (α).

Afin de mieux comprendre l'impact de ces différents paramètres sur l'efficacité du transfert de protons, nous avons réalisé des simulations présentant l'évolution du PTR en fonction du temps de saturation pour différentes conditions d'échange de protons représentatives d'échanges typiquement rencontrés pour la plupart des agents CEST (**Figure III.7**).

Nous pouvons ainsi observer une amplification du signal lorsque le T_1 s'allonge (**Figure III.7a**). Or, on sait que ce paramètre augmente avec le champ magnétique ce qui démontre le grand potentiel de cette modalité d'imagerie à haut champ.

Nous pouvons également faire état d'une hausse du PTR lorsque le taux d'échange augmente (**Figure III.7d**). Cette relation est bien sûr limitée par la condition d'observation de l'effet CEST définie dans la partie **IV.B.2**. Au-delà de cette limite, l'échange devient impossible car les protons A et B se retrouveraient dans un état moyen intermédiaire.

On remarque également que le signal augmente lorsque l'intensité de saturation B_1 augmente (**Figure III.7c**). Ici nous nous plaçons dans le cas d'une saturation faible, or si le B_1 devient trop important le régime de saturation change et la saturation affectera non seulement les protons du soluté mais également une partie des protons de l'eau libre. Il est donc nécessaire de limiter au maximum cette saturation dite directe (également appelée *spillover effect*) tout en obtenant un effet CEST maximal. Il est possible de déterminer une puissance de saturation optimale pour laquelle la contribution de la saturation du pool B est maximale vérifiant la relation (Sun et al., 2005; Woessner et al., 2005) :

$$k_{BA} = \omega_{1opt} = 2\pi\gamma B_{1opt} \quad (III.32)$$

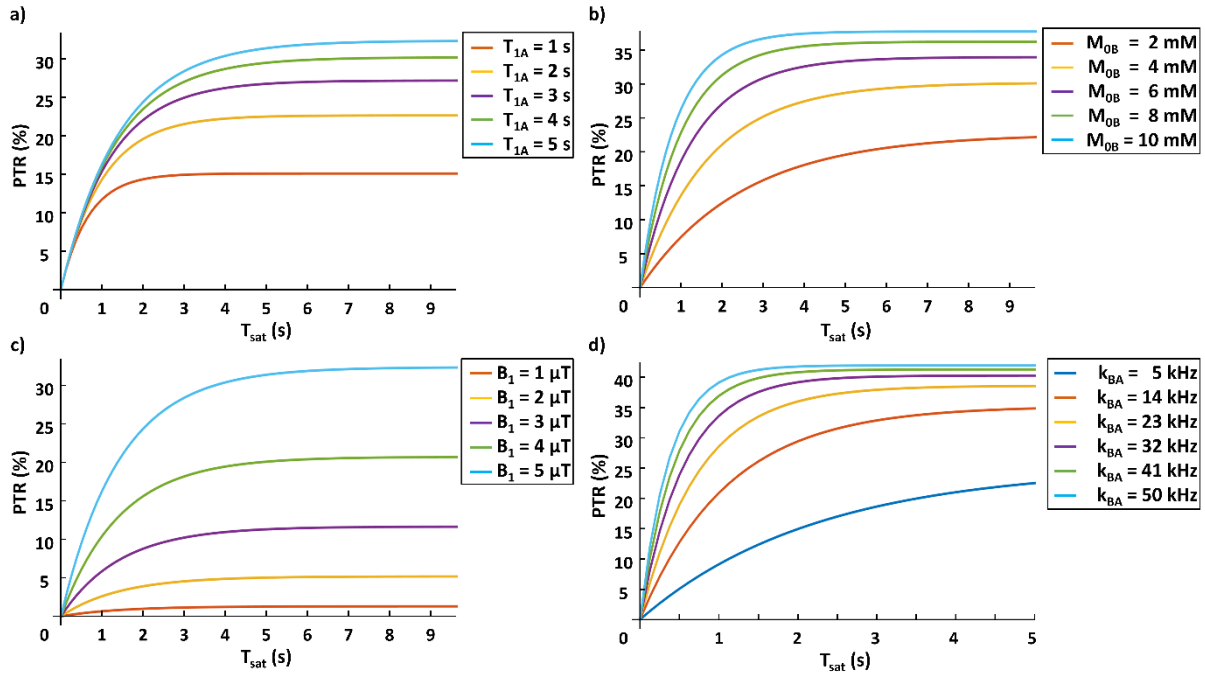


Figure III.7 : Influence du T_1 , du B_1 , du taux d'échange k_{BA} et de la concentration de protons du pool B M_{0B} .

Le signal du PTR a été simulé pour un t_{sat} de 10 s et une concentration du pool A de 100M en faisant varier les paramètres suivants :

- Le T_1 du pool A (de 1 à 5 secondes) pour un pool B concentré à 5 mM, un taux d'échanges k_{BA} de 10 kHz, une saturation B_1 de 5 μT et une efficacité de saturation α de 0,45.
- La concentration du pool B (de 1 à 10 mM) pour un k_{BA} de 10 kHz, un B_1 de 5 μT et un T_{1A} de 5 s et une efficacité de saturation α de 0,45.
- L'intensité de saturation (B_1 de 1 à 5 μT) pour un pool B concentré à 5 mM, un taux d'échanges k_{BA} de 10 kHz et un T_{1A} de 5 s.
- Le taux d'échange k_{BA} (de 5 à 50 kHz) pour un pool B concentré à 5 mM, un B_1 de 5 μT et un T_{1A} de 5 s et une efficacité de saturation α de 0,45.

L'intérêt majeur de l'imagerie CEST concerne la dépendance à la concentration du pool B (**Figure III.7b**). Cette technique permet donc de détecter les protons du soluté peu concentré comparé à l'eau libre et ce de façon indirecte via les échanges chimiques. De ce fait, nous pouvons conclure que le transfert de saturation permet d'améliorer la détection du pool B d'un facteur d'amplification caractérisé à partir de l'équation (III.33) :

$$FA = \frac{M_{OA} - M_{ZA}}{M_{0B}} = \frac{PTR \cdot M_{OA}}{M_{0B}} = \frac{\alpha \cdot k_{BA}}{R_{1A} + k_{AB}} \frac{M_{ZB}}{M_{ZA}} (1 - e^{-(R_{1A} + k_{AB})t}) \quad (III.33)$$

De cette manière, si on prend l'exemple de la courbe jaune sur la **figure III.7a** correspondant à $\alpha = 0,45$, $k_{BA} = 10$ kHz, $T_{1A} = 2$ s, $M_{0A} = 100$ M et $M_{0B} = 5$ mM, on obtient une variation d'environ 22 % du signal des protons du pool A équivalente à un facteur d'amplification de 4400. Grâce à ce facteur d'amplification important, l'imagerie CEST constitue une méthode de choix pour améliorer la détection d'espèces peu concentrées *in vivo*.

III. Caractérisation de l'effet CEST

D'après les équations décrites précédemment, on constate que la nature des pics relatifs à chaque population de protons dépend grandement de leur taux d'échange. La valeur du T_2 de chaque groupe de protons, négligée dans les équations pour simplification, aura une influence sur la forme du pic : la largeur à mi-hauteur est en effet proportionnelle au taux de relaxation transversal ($1/T_2$). Ainsi, le phénomène de transfert de saturation du soluté vers le solvant aura lieu pour une plage de fréquences de saturation.

En pratique, pour caractériser l'effet CEST, il convient de mesurer l'aimantation longitudinale M_{ZA} du groupe de protons observables (pool A) en fonction de la fréquence de saturation appliquée. Pour une lecture plus aisée, l'aimantation longitudinale mesurée à une fréquence de saturation donnée est normalisée par l'aimantation sans saturation M_{0A} . L'évolution de ce signal normalisé M_{ZA} / M_{0A} est ensuite tracée en fonction de la fréquence de saturation pour obtenir un Z-spectrum tel qu'illustré sur la **figure III.8** (Grad et al., 1991).

L'analyse du Z-spectrum permet de repérer deux minima : le minimum absolu correspondant à la saturation directe des protons du pool A et un minimum local observé à la fréquence de saturation du pool B. On constate également que lorsque la saturation est appliquée hors-résonance, la fraction d'aimantation M_{ZA} / M_{0A} maximale ne vaut pas 100%. Ceci est dû à la saturation directe des protons observés désignée par le terme *spillover effect* et considérée comme symétrique par rapport à la fréquence de l'eau libre. Pour caractériser l'effet CEST et s'affranchir de la contribution de la saturation directe des protons de l'eau libre, on calcule le ratio de transfert d'aimantation asymétrique désigné par l'acronyme MTRasym (pour *asymetrical Magnetization Transfer Ratio*) selon la relation suivante :

$$MTRasym(\delta_{sat}) = \frac{M_{ZA}(-\Delta\omega_B) - M_{ZA}(\Delta\omega_B)}{M_{0A}} \quad (III.34)$$

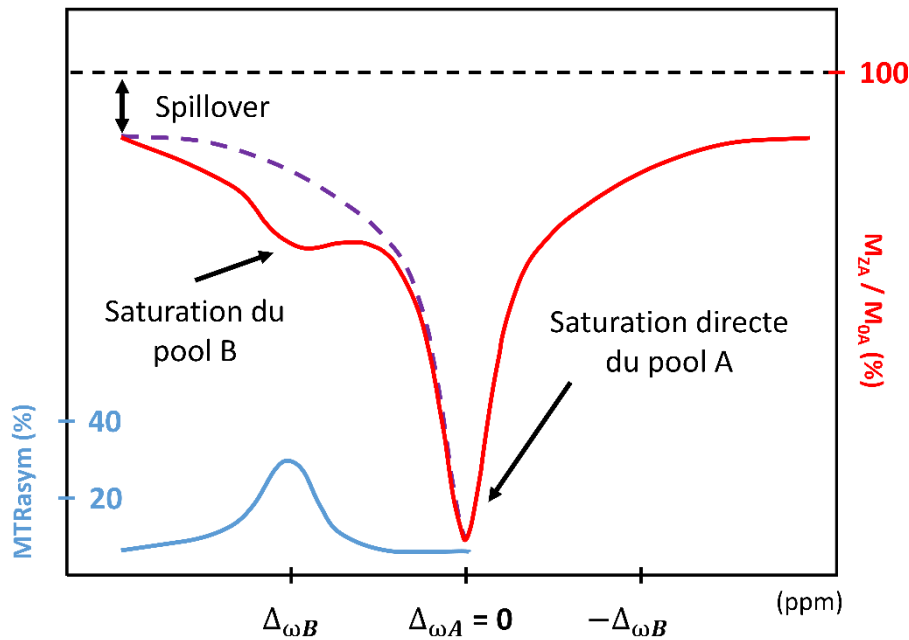


Figure III.8 : Exemple de Z-spectrum et MTRasym typique d'un modèle à deux compartiments.

Cette figure montre un Z-spectrum (courbe rouge) sur lequel on aperçoit les effets de la saturation sur les protons du pool B (à la fréquence $\Delta\omega_B$) ainsi que sur ceux du pool A (à la fréquence $\Delta\omega_A$ et *spillover effect*).

Le calcul du MTRasym (courbe bleue) est effectué par soustraction de la partie positive du Z-spectrum (fréquences supérieures à $\Delta\omega_A$) à la partie négative (fréquences inférieures à $\Delta\omega_A$) correspondant à la courbe violette. De manière générale, la fréquence du pool A est ramenée à 0 ppm pour faciliter la lecture du Z-spectrum.

En conclusion, pour parvenir à optimiser la détection de la molécule d'intérêt lors d'une acquisition CEST, il est important de prêter attention à un certain nombre de paramètres concernant l'impulsion de saturation :

- La fréquence de saturation ($\Delta\omega_B$) : la saturation doit être appliquée sur une plage de fréquences centrée sur la fréquence de l'eau et irradiant la fréquence de la molécule d'intérêt.
- La durée d'application de la saturation (t_{sat}) : plus les échanges seront lents et plus la saturation mettra de temps à être transférée à l'eau libre. Pour maintenir les protons saturés le temps de l'échange, il faudra donc adapter t_{sat} en fonction du taux d'échange : plus il sera lent, plus la saturation devra être appliquée longtemps.
- L'intensité de la saturation (B_1) : plus les échanges sont rapides, plus elle doit être importante (tout en respectant la relation (III.32) pour limiter la saturation directe).

Par ailleurs, la différence entre les déplacements chimiques augmentant avec l'intensité du champ extérieur B_0 , il est possible d'améliorer la sensibilité de l'effet CEST pour des molécules ayant des taux d'échange plus élevé en travaillant à haut champ ($B_0 > 7$ Teslas).

Ainsi le glutamate, avec un k_{ex} de 1000 Hz et une différence de déplacements chimiques de 3 ppm, ne peut pas être détecté à 3 T (car $|\Delta_s - \Delta_w| = 400$ Hz) mais peut l'être à 11,7 T (car $|\Delta_s - \Delta_w| = 1500$ Hz) comme le montre la simulation effectuée à partir des équations de Bloch-McConnell (**Figure III.9**).

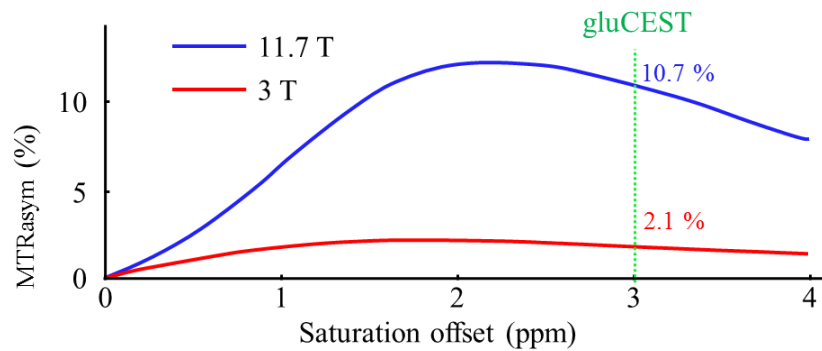


Figure III.9 : Simulation de la sensibilité de l'effet CEST du glutamate à 3 T et 11,7 T.

Dans ce chapitre, nous avons fait état des principes théoriques relatifs à l'imagerie CEST. Dans le chapitre suivant, nous ferons une revue non exhaustive des différentes applications possibles de cette modalité d'imagerie et de leur potentiel intérêt pour l'étude des pathologies cérébrales.

Chapitre IV : Imagerie CEST, une grande diversité d'applications

Dans le chapitre II de ce manuscrit, nous avons présenté brièvement quelques utilisations possibles de l'IRM afin de diagnostiquer ou de suivre l'évolution des maladies neurodégénératives. Les biomarqueurs utilisés en IRM conventionnelle sont pour la plupart issus de mesures anatomiques macroscopiques (atrophie du striatum dans la maladie de Huntington par exemple) ou des modifications de paramètres de relaxations (T_1 , T_2 ou T_2^*) des tissus reflétant une altération à grande échelle des structures. Bien que très utiles, ces biomarqueurs renseignent assez peu sur l'origine de la maladie et ne fournissent que très peu d'informations sur les processus biologiques liés à la pathologie.

Comme énoncé précédemment, l'imagerie CEST est une modalité de contraste IRM qui permet de visualiser indirectement des molécules très diluées et qui sont invisibles en IRM classique en raison de leur faible concentration. Grâce à l'imagerie CEST et au facteur d'amplification de la méthode, il est donc possible de détecter des molécules très diluées comme des métabolites. Ces molécules sont particulièrement importantes d'un point de vue biologique car elles sont impliquées dans nombre de processus dans le cerveau sain mais aussi dans des conditions pathologiques. Cette technique est donc en mesure de fournir des informations similaires à celles recueillies par SRM. Cependant, l'imagerie CEST présente l'avantage d'offrir une excellente résolution spatiale, permettant ainsi l'étude spécifique de certaines régions du cerveau. Cette combinaison d'avantages (résolution et spécificité) a donné lieu au concept d'imagerie métabolique par IRM. De plus, cette méthode d'imagerie ne nécessite pas, pour la plupart des applications, d'injection d'agents de contraste exogènes. Le contraste CEST étant un contraste de type ON/OFF, la visualisation de la molécule d'intérêt ne dépend que de l'application de l'impulsion de saturation à la bonne fréquence.

Comme décrit dans le chapitre III, l'intensité de l'effet CEST dépend du taux d'échange des protons labiles ou des molécules d'eau en échange. L'imagerie CEST est donc sensible aux paramètres physiologiques tels que la température ou le pH. Dans ce chapitre de revue bibliographique, nous tenterons de donner au lecteur un panorama non exhaustif des différentes applications possibles de l'imagerie CEST. Nous tenterons néanmoins d'aborder les points qui offrent des perspectives intéressantes dans le cadre de l'étude des maladies cérébrales.

I. Types de transfert d'aimantation

Le principe de l'imagerie CEST repose sur l'observation des transferts d'aimantation entre diverses molécules ayant des interactions avec l'eau libre. En fonction du type de molécules impliquées dans ce transfert d'aimantation, le phénomène peut prendre plusieurs formes dépendant principalement de la taille et de la mobilité de ces molécules. On distingue ainsi le transfert d'aimantation issu d'un couplage dipolaire entre molécules de grandes tailles dénommé effet MTC (pour *Magnetization Transfer Contrast*) et le transfert par échanges chimiques (**Figure IV.1b**). Ce dernier peut également être divisé en plusieurs catégories en fonction de la nature des échanges (atomiques, moléculaires ou compartimentés). Dans cette partie, nous décrirons brièvement les différents types de transfert observables *in vivo* ainsi que les différents types d'échanges observés.

A. Effets MTC et NOE

L'effet MTC traditionnel est issu de l'application d'une saturation à une fréquence éloignée de la fréquence de l'eau libre (plus de 10 ppm d'écart). L'impulsion n'aura aucun effet sur les protons provenant de molécules mobiles. Néanmoins, la saturation affectera partiellement les protons des tissus semi-solides possédant un T_2 très court et présentant un couplage dipolaire avec les spins voisins. La distribution des fréquences de résonance des protons liés aux macromolécules est très large (plusieurs dizaines de ppm) qui entraîne un transfert de saturation à travers les molécules semi-solides et même à l'eau (Edzes and Samulski, 1977; Wolff and Balaban, 1989). Bien que remis en cause par certaines études récentes, cet effet est considéré comme étant symétrique par rapport à la fréquence de l'eau libre et dépend peu de l'intensité du champ B_0 du fait du T_2 très court des macromolécules.

Les couplages dipolaires de spins peuvent générer d'autres transferts de polarisation. De cette manière, on peut observer un transfert de l'aimantation entre deux pools à travers le phénomène de relaxation croisée (**Figure IV.1a**) : l'effet NOE (pour *Nuclear Overhauser Enhancement*). Plusieurs types d'effet NOE peuvent être distingués. Tout d'abord, l'aimantation peut être transmise par relaxation croisée seule, à l'instar de l'effet MTC, pour des macromolécules peu mobiles (le transfert devient plus efficace quand la mobilité diminue) lorsque l'impulsion est appliquée à leur fréquence de résonance (**Figure IV.1c**). En cas d'expérience de transfert d'aimantation par le biais d'échanges avec l'eau libre, on différencie trois effets NOE contribuant au signal de l'eau. S'il y a saturation ou labélisation des protons de l'eau, ces derniers peuvent être transférés aux macromolécules par le biais d'échanges chimiques pour ensuite propager l'aimantation par relaxation croisée aux spins voisins : on parle d'effet NOE relayé par les échanges (**Figure IV.1d**). Il est également possible d'observer l'effet inverse, c'est-à-dire que la polarisation est appliquée aux protons des macromolécules et se transmet tout d'abord aux protons voisins par relaxation croisée pour enfin être transférée à l'eau libre par le biais d'échanges chimiques (**Figure IV.1e**). Il s'agit ici d'échanges de l'effet NOE relayé (effet rNOE) qui est l'effet NOE principalement détecté lors d'expériences CEST. Et pour finir, il existe un effet NOE relayé intracellulaire qui fonctionne de la même façon que l'effet rNOE si ce n'est qu'il n'y a pas échange de proton avec l'eau libre mais plutôt un transfert dipolaire avec l'eau liée à la protéine (**Figure IV.1f**). Cet effet est négligeable pour les protéines mobiles (Liepinsh and Otting, 1996).

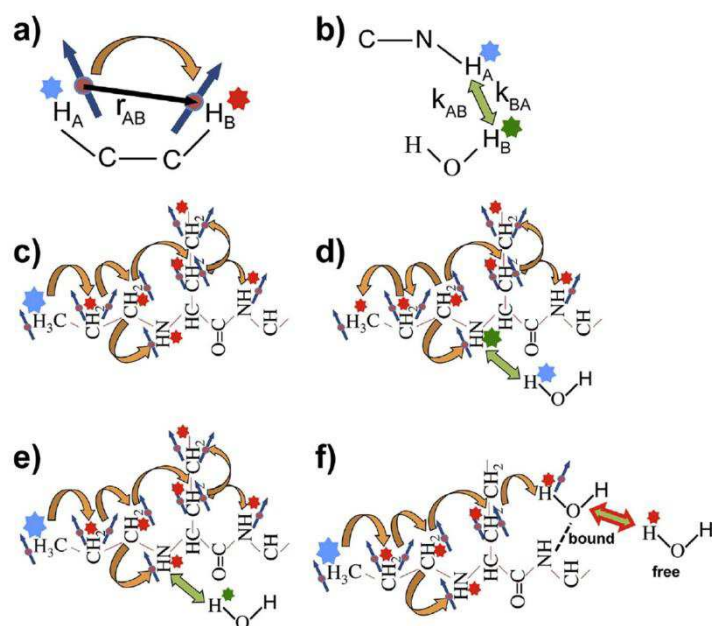


Figure IV.1 : Nomenclature et terminologie du transfert d'aimantation (van Zijl et al., 2017)

L'étoile bleue désigne l'endroit où la RF est appliquée. L'étoile rouge indique un transfert d'aimantation par couplage dipolaire. L'étoile verte indique un transfert d'aimantation par échange de proton.

- a. Transfert par relaxation croisée (flèche orange) entre des protons ayant un couplage dipolaire.
- b. Transfert par échange chimique.
- c. Transfert d'aimantation par couplage dipolaire relayé.
- d. Effet NOE relayé par des échanges chimiques.
- e. Effet rNOE
- f. Effet NOE intracellulaire relayé.

B. Echanges chimiques

L'origine du contraste CEST repose sur l'échange de saturation entre deux groupes de protons ayant un environnement électronique différent. Ces groupes de protons présentent alors des fréquences de résonance différentes et peuvent être distinguées si elles présentent des caractéristiques compatibles avec l'observation d'un effet CEST (équation III.1 du chapitre précédent). La nature des échanges varie selon l'espèce chimique impliquée : le transfert d'aimantation peut se faire au niveau atomique, moléculaire ou de façon compartimentée comme montré sur la **figure IV.2**. L'efficacité du transfert de protons saturés (PTR) va donc être modifiée en fonction du type d'échanges mis en jeu. Ainsi, si on prend l'expression du PTR suivante (décrite dans le chapitre précédent) :

$$PTR = \frac{\alpha \cdot k_{BA}}{R_{1A} + k_{AB}} \frac{M_{ZB}}{M_{ZA}} (1 - e^{-t_{sat}(R_{1A} + k_{AB})}) \quad (\text{IV.1})$$

En considérant que les protons du pool A ne sont pas affectés par la saturation ($k_{AB} = 0$), il est possible de dériver une expression simplifiée du PTR dénommée PTE (pour *Proton Transfer Enhancement*) :

$$PTE = \frac{N_E \cdot \alpha \cdot k_{BA}}{R_{1A}} (1 - e^{-R_{1A} \cdot t_{sat}}) \quad (IV.2)$$

avec α , l'efficacité de saturation, k_{BA} , le taux d'échange des protons de l'agent CEST vers l'eau libre, T_{1A} , le temps de relaxation longitudinale de l'eau libre et enfin N_E , le nombre de protons labiles contribuant à l'effet CEST. Ce dernier terme dépend du type d'échange (**Figure IV.2**).

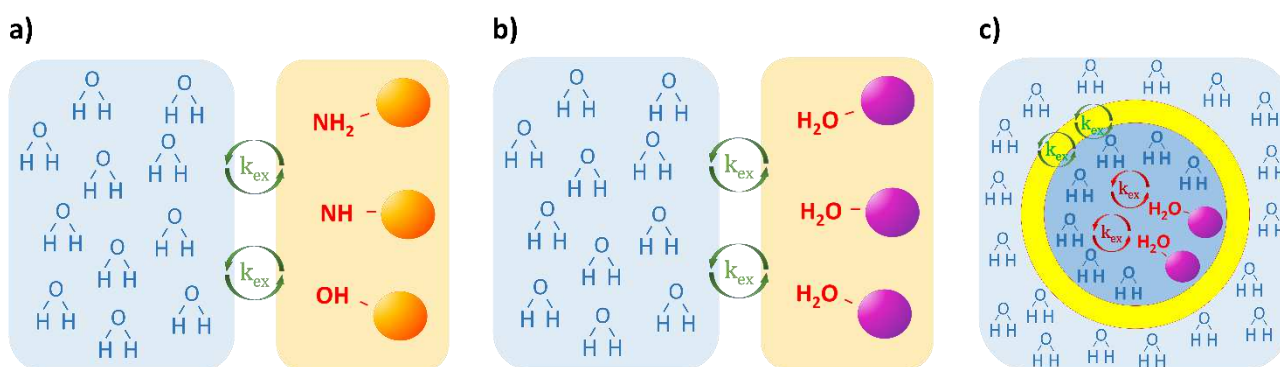


Figure IV.2 : Description des différents types d'échanges chimiques entraînant un transfert de saturation.

- Echanges atomiques (^1H). Ces échanges ont lieu avec des molécules échangeant des protons labiles saturés (en rouge) appartenant à des fonctions $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ et $-\text{NH}$. Ce type de transfert est caractéristique de molécules endogènes diamagnétiques (d'où l'appellation diaCEST).
- Echanges moléculaires. Lors de ce type d'échanges, des molécules d'eau saturées (en rouge) de l'agent sont transférées à l'eau libre. On retrouve principalement ces échanges avec les agents CEST composés de complexes paramagnétiques (en violet) d'où la dénomination paraCEST.
- Echanges compartimentés. L'agent CEST est encapsulé dans un liposome (en jaune) et en échange rapide (k_{ex} rouge) avec l'eau du compartiment. Les molécules d'eau saturées (en rouge) sont ensuite transférées à l'eau libre à un taux d'échanges plus lent (k_{ex} vert).

Pour chaque type d'échanges décrits sur la figure ci-dessus, nous avons donc :

- Pour les échanges atomiques, $N_E = N_{CA} \cdot M_{CA}$
 N_{CA} est le nombre de noyaux labiles (généralement des protons) par kiloDalton (kDa) de l'agent CEST.
 M_{CA} est la masse moléculaire de l'agent de contraste.
 Pour cette catégorie d'échanges, le contraste provient essentiellement de la valeur du taux d'échanges individuels des protons.
- Pour les échanges moléculaires, $N_E = C_m \cdot N_m \cdot M_{CA}$
 C_m est le nombre de molécules échangées par kDa.
 N_m est le nombre de protons dans la molécule échangée.
 Pour ce type d'échanges, le PTE dépend de la durée de vie de la molécule sur l'agent CEST ainsi que du taux d'échange des protons de la molécule échangée. A noter que si la molécule échangée est l'eau, l'effet ne peut être différencié de celui provenant des échanges de protons classiques.
- Pour les échanges compartimentés, $N_E = 2 \cdot N_A \cdot [H_2O] \cdot V_{comp}$
 N_A est le nombre d'Avogadro ($6,0 \times 10^{23}$ molécules par mole).
 $[H_2O]$ est la concentration de l'eau libre soit 55,6 M.
 V_{comp} est le volume du compartiment en litres : par exemple, pour un liposome sphérique de rayon interne R, $V_{comp} = \frac{4\pi R^3}{3}$.
 Le taux d'échanges dans ce cas dépendra de la perméabilité, de la taille et de la constitution de la membrane du compartiment.

Les échanges moléculaires concernent principalement les agents CEST paramagnétiques (paraCEST). Ils sont caractérisés par la présence de complexes lanthanides (métaux) augmentant le déplacement chimique et échangeant des molécules d'eau à des taux très élevés. Les échanges compartimentés quant à eux sont généralement définis par l'utilisation de liposomes emprisonnant un compartiment aqueux dans lequel sont encapsulés des complexes lanthanides en échanges rapides avec l'eau contenue dans le liposome et en échanges lents avec l'eau extra-liposomale (Aime et al., 2005). Cette thèse s'intéressant principalement au contraste CEST endogène, nous ne développerons pas ces modalités d'imagerie CEST.

Pour améliorer le PTE, il est important d'optimiser le terme N_E et plus particulièrement en augmentant le nombre de protons échangeables pour permettre à l'effet CEST d'être mesurable pour des concentrations d'agent plus faibles. L'efficacité de saturation quant à elle dépend principalement de l'intensité du B_1 et du taux d'échange (cf chapitre III). Il s'agit donc de trouver le bon compromis entre ces deux paramètres pour obtenir le meilleur PTE possible en sachant qu'une fréquence d'échange suffisamment élevée permet de compenser le manque d'efficacité de la saturation pour des puissances raisonnables ($< 10 \mu T$) (**Figure IV.3a**).

En observant les taux d'échanges et les concentrations des protons détectables par imagerie CEST, c'est-à-dire avec un signal CEST d'au moins 5%, il est possible de comparer la sensibilité de différents groupes de protons. Les protons rencontrés *in vivo* tels que les protons hydroxyles (-OH), amines (-

NH₂) et amides (-NH) nécessitent donc une concentration de l'ordre du mM pour générer un effet CEST discernable. On notera toutefois une meilleure sensibilité des protons amides du fait de leur faible taux d'échanges (*figure IV.3b*).

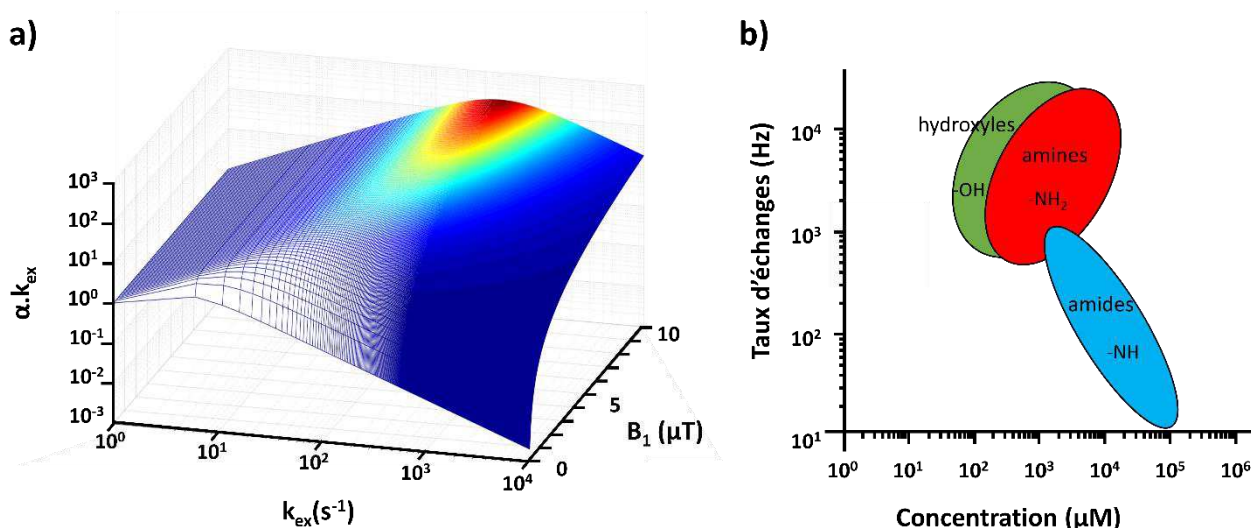


Figure IV.3 : Description des paramètres de détection des différentes espèces de protons (figure inspirée de la revue de van Zijl et al., 2011).

- Effets du taux d'échange k_{ex} et de l'intensité de saturation B_1 sur l'efficacité de saturation. On observe une diminution de l'efficacité lorsque la fréquence d'échanges augmente. On peut également voir que cet effet est compensé en augmentant le B_1 .
- Graphique représentant les concentrations et taux d'échanges de chaque espèce de protons nécessaires pour obtenir un effet CEST de 5 %.

II. CEST endogène (diaCEST)

Depuis son introduction par Ward, Aletras & Balaban en 2000, le potentiel de l'imagerie CEST pour l'étude des pathologies a été mis en évidence par le biais de diverses applications. Le CEST a notamment été utilisé pour identifier le grade des glioblastomes (Zhou et al., 2017) ou suivre l'évolution de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Cai et al., 2013; Haris et al., 2013a) ou la maladie de Huntington (Pépin et al., 2016). Le domaine le plus exploré, de par son caractère non-invasif (sans injection d'agents de contraste extérieurs), concerne les métabolites présents en assez grande quantité *in vivo* pour être détectables par imagerie CEST. Ces agents CEST endogènes sont appelés agents CEST diamagnétiques. C'est le cas notamment du glutamate, du myo-inositol, du glucose, du glycogène ou encore de la créatine qui sont des métabolites naturellement présents *in vivo*. La possibilité de détecter et d'imager ces molécules offre des perspectives intéressantes pour l'étude de mécanismes ou de pathologies les impliquant. L'imagerie de ces composés s'appelle imagerie diaCEST mais porte en général un nom spécifique pour chaque type de molécule. Leur déplacement chimique par rapport à l'eau libre reste relativement modeste,

généralement compris entre -4 et 4 ppm, ce qui rend leur détection sensible à l'homogénéité du champ magnétique statique B_0 . Il est donc en général nécessaire d'apporter une attention particulière à la correction ou la prise en compte des inhomogénéités de champs B_0 . Les agents diaCEST peuvent être classés en trois différents groupes correspondant aux types de protons échangés : les protons amides (-NH), amines (-NH₂) et les protons hydroxyles (-OH).

A. Protons amides (-NH)

L'effet CEST des protons amides, très concentrés *in vivo*, est nommé APT (pour *Amide Proton Transfer*). Le taux d'échanges des protons amides est relativement lent (de l'ordre de 30 Hz) ce qui rend l'imagerie APT compatible avec les scanners à bas champs (< 7 T), c'est-à-dire avec les IRM cliniques.

Les protons amides impliqués dans l'imagerie APT sont issus de protéines et de peptides présents dans les tissus. Ces protons -NH labiles résonnent à une fréquence de 3,5 ppm par rapport à l'eau libre et la saturation est réalisée par le biais d'une onde RF de faible puissance appliquée pendant un temps de saturation long.

La première application du contraste APT a été effectuée sur un modèle rat d'ischémie (Zhou et al., 2003). L'ischémie est connue pour entraîner une baisse du pH dans les tissus affectés. Ces changements de pH sont à la source de variations du taux d'échange qui entraînent une diminution du signal APT dans les tissus ischémiques. Il est donc possible de cartographier les changements de pH *in vivo* à partir de l'effet APT. Par ailleurs, ce type de contraste a aussi été appliqué à d'autres pathologies similaires telles que l'occlusion de l'artère cérébrale centrale (Sun et al., 2013).

L'imagerie APT est également largement utilisée pour étudier le développement des tumeurs. A l'apparition d'une tumeur, la concentration des protéines augmente et le métabolisme glycolytique devient prépondérant. Cela entraîne une forte variation pH, ayant pour conséquence d'accroître le taux d'échange et, par conséquent, aboutir à augmentation du contraste APT. L'étude du contraste APT se révèle plus efficace que les techniques d'imagerie habituellement utilisées pour caractériser les tumeurs telle que l'imagerie FLAIR (pour *Fluid-Attenuated Inversion Recovery*) par exemple. En effet, avec l'APT, il est ainsi possible de définir les différents grades de la tumeur (Zhao et al., 2013; Zhou et al., 2013) ou encore de distinguer diverses parties de la tumeur telles les nécroses (faible contraste APT) dues aux irradiations (méthode commune de traitement du cancer) et la récurrence de la tumeur (contraste APT élevé) (Zhou, 2011). Même si les applications de l'étude APT des tumeurs se font majoritairement sur des tumeurs cérébrales, plusieurs travaux ont démontré la faisabilité de l'imagerie APT sur les cancers du sein (Donahue et al., 2016), de la prostate et de la vessie (Jia et al., 2011), ou encore sur la sclérose en plaques (Dula et al., 2011).

En conclusion, le régime d'échanges lent et l'abondance naturelle des protons amides font de l'imagerie APT la modalité CEST la plus implantée sur des IRM cliniques. De par son utilité pour le diagnostic des tumeurs, certains protocoles sont actuellement menés sur des patients atteints de tumeur cérébrale (Jinyuan Zhou, John Hopkins University).

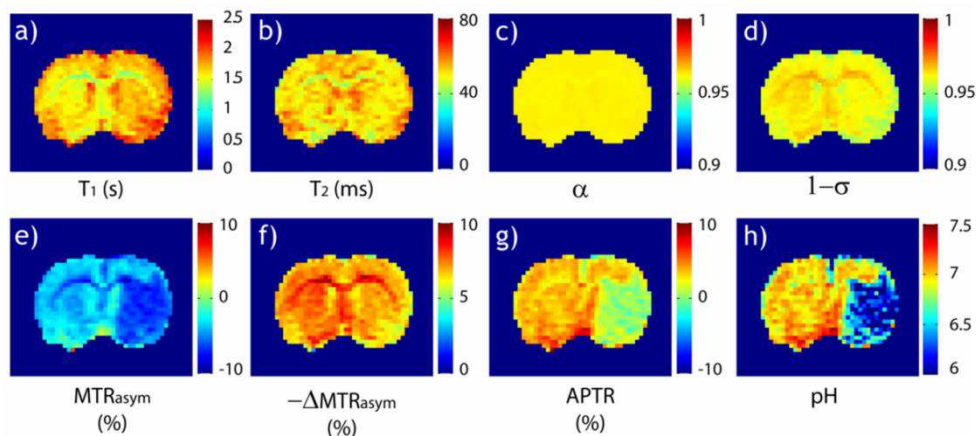


Figure IV.4 : Utilisation du contraste APT pour cartographier le pH dans le cerveau. Exemple d'un cas d'ischémie chez le rat. (Sun et al., 2012).

B. Protons amines (-NH₂)

L'imagerie CEST peut également être sensible aux protons amines de certains acides aminés, de protéines ou de peptides contenus dans les tissus biologiques. Ces protons résonnent sur une gamme de fréquences allant de 1,8 à 3 ppm et se trouvent généralement dans un régime d'échange rapide (>1000Hz). En conséquence, l'effet CEST ne sera détectable qu'à des intensités de champ B_0 élevées (>7T) et nécessitera l'application d'une impulsion RF d'intensité modérée (de l'ordre de quelques μ T) pour parvenir à une saturation correcte. Les principales applications de cette classe d'agents CEST concernent deux métabolites : le glutamate et la créatine.

1. Le glutamate

Le glutamate est un des principaux neurotransmetteurs du système nerveux central. Il est impliqué dans différentes fonctions cérébrales telles que la mémoire ou la cognition et semble être un marqueur potentiel des désordres neurologiques associés aux maladies neurodégénératives. Le signal CEST du glutamate, se situant à environ 3 ppm par rapport à l'eau et désigné par l'acronyme gluCEST. L'effet gluCEST est bien évidemment dépendant de la concentration en glutamate mais également à l'environnement physiologique du milieu. En effet, les protons amines sont relativement labiles donc le pH aura une influence plutôt forte sur l'effet gluCEST.

La première application en 2012 concernait d'ailleurs l'évolution du signal gluCEST dans un modèle rat d'ischémie provoquée par occlusion de l'artère cérébrale centrale (Cai et al., 2012). On observe dans les tissus ischémiques une forte hausse du contraste gluCEST directement liée à la réduction du pH. L'intérêt principal de l'imagerie gluCEST réside toutefois dans l'étude des maladies neurodégénératives tant sur des modèles animaux (maladie d'Alzheimer : Haris et al., 2013 - maladie de Huntington : Pépin

et al., 2016) que chez l'humain (Cai et al., 2013). Les maladies neurodégénératives entraînant un dysfonctionnement et éventuellement une mort des cellules neuronales, la concentration en glutamate peut être affectée. Cette altération peut être mesurée par l'imagerie gluCEST. Ainsi, grâce aux informations relatives aux changements dans la distribution du glutamate, il est possible d'obtenir des indications sur l'implication de différentes régions aux divers stades d'avancement des maladies neurodégénératives. Le gluCEST peut également être appliqué à la moelle épinière notamment pour l'investigation des lésions ou des problèmes neurologiques tels que l'ataxie. L'imagerie gluCEST constitue le cœur de cette thèse et sera extensivement abordé dans les chapitres suivants.

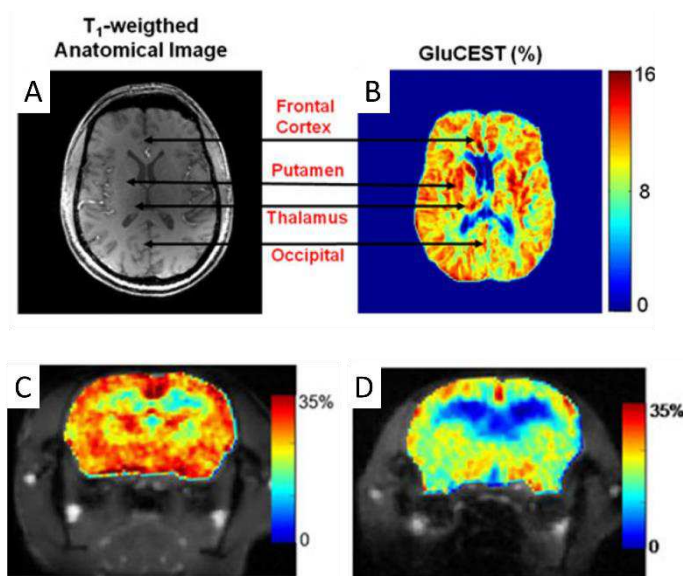
Figure IV.5 :

Exemple d'applications de l'imagerie gluCEST sur la maladie d'Alzheimer.

A et B. Images anatomique et gluCEST d'un patient Alzheimer (Cai et al., 2013).

C. Images gluCEST d'une souris contrôle.

D. Image gluCEST d'une souris APP-PS1 (modèle Alzheimer) montrant un faible contraste gluCEST comparée à la souris contrôle (Haris et al., 2013).



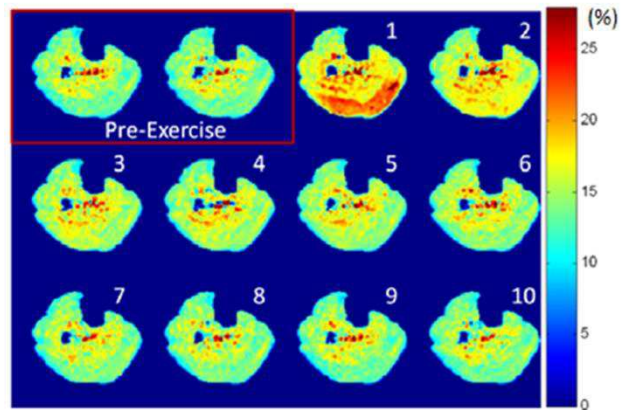
2. La créatine

La créatine (Cr) est une molécule issue de l'enzyme créatine-kinase (CK) qui contrôle la conversion réversible de la créatine en phosphocréatine (PCr). Ce métabolite joue un rôle important dans la transmission et le stockage des complexes phosphates liés au métabolisme énergétique. Pendant un exercice musculaire, la PCr est consommée pour maintenir l'approvisionnement de l'ATP. En conséquence, le niveau de créatine augmentera dans le but de répondre aux besoins du muscle faisant de la créatine un marqueur potentiel du métabolisme énergétique musculaire. L'effet CEST de la créatine (CrCEST) est directement lié à la concentration de créatine et est localisé à environ 1,8 ppm. Les principales applications de l'imagerie CrCEST à ce jour ont été réalisées sur le muscle du mollet (Kogan et al., 2014). Ces études montrent une augmentation du contraste CrCEST juste après un effort musculaire puis une diminution progressive jusqu'à atteindre le niveau initial durant la phase de repos. L'effet CrCEST procure donc des informations essentielles sur le métabolisme énergétique musculaire et, contrairement aux études habituellement faites par spectroscopie RMN du Phosphore ^{31}P , apporte une très bonne résolution spatiale. Cette technique offre des perspectives intéressantes pour l'étude d'autres muscles tels que le muscle du myocarde.

Figure IV.6

Exemple d'application de l'imagerie CrCEST (Kogan et al., 2014).

Images CrCEST du muscle du mollet avant et après exercice. On peut observer des variations du contraste CrCEST liées au métabolisme de la Créatine dû à l'exercice physique.



C. Protons hydroxyles (-OH)

L'imagerie CEST de ces protons permet d'être sensible à des molécules telles que le glucose, le glycogène ou encore le glycosaminoglycane (important constituant du cartilage) ainsi qu'à des métabolites comme le myo-Inositol. De par leur taux d'échanges plutôt élevés (500 à 1500 Hz) et leur résonnance au voisinage de celle de l'eau (+ 0,5 à 1,5 ppm), la détection des protons -OH nécessite une très bonne résolution spectrale (d'où l'intérêt de travailler à haut champ) et l'utilisation d'une saturation de faible intensité dans le but de limiter les effets de la saturation directe des protons de l'eau. En raison de leur déplacement chimique proche de l'eau, il est également nécessaire de corriger les inhomogénéités de B_0 pour assurer une quantification pertinente de l'effet CEST.

1. Le glycogène

Le glycogène (Gly) est la principale forme de stockage du glucose et joue un rôle important dans la régulation des paramètres physiologiques (homéostasie). En 2006, l'équipe de Peter van Zijl démontre qu'il est possible d'être sensible à la concentration de glycogène *in vivo* par le biais de l'imagerie CEST. Dans cette étude, on peut observer une baisse du signal CEST du glycogène (résonnant à une fréquence d'environ 1 ppm) dans le foie de souris pré- puis post-injection de glucagon (hormone déclenchant la glycogénolyse). Cette diminution est donc directement corrélée à la consommation de Gly observée d'ordinaire par spectroscopie ^{13}C . Cette modalité d'imagerie CEST offre ainsi l'opportunité de mesurer les altérations du métabolisme du glycogène caractéristiques de pathologies telles que l'obésité, le diabète de type II ou encore la résistance à l'insuline.

2. Le glucose

Une des applications les plus prometteuses concerne l'imagerie CEST du glucose (glucoCEST). A la différence du glycogène, le glucose échange un plus grand nombre de protons ce qui conduit à une résonnance multiple d'une plus grande largeur spectrale (1,2 à 2,9 ppm – Walker-Samuel, 2013). Le glucose est la principale source d'énergie du corps humain et les défauts de son métabolisme apparaissent dans diverses pathologies. Ainsi, dans les cas de cancers par exemple, le développement

de la tumeur est caractérisé par une augmentation de l'absorption de glucose (effet Warburg – (Pedersen, 2007)). Les applications précliniques (Walker-Samuel et al., 2013) et cliniques (Xu et al., 2015) du glucoCEST ont permis de mesurer cette surconsommation de glucose provenant de la tumeur. Dans les maladies psychiatriques ou neurodégénératives, on peut observer une diminution du métabolisme du glucose. Par conséquent, le développement du glucoCEST pour l'étude du métabolisme cérébral (Nasrallah et al., 2013) pourrait s'avérer être un biomarqueur approprié pour l'étude de l'avancement de troubles neurologiques. L'imagerie glucoCEST a été abordée au cours de cette thèse. Le principe et les premiers développements méthodologiques seront décrits dans le chapitre **IX** de ce manuscrit.

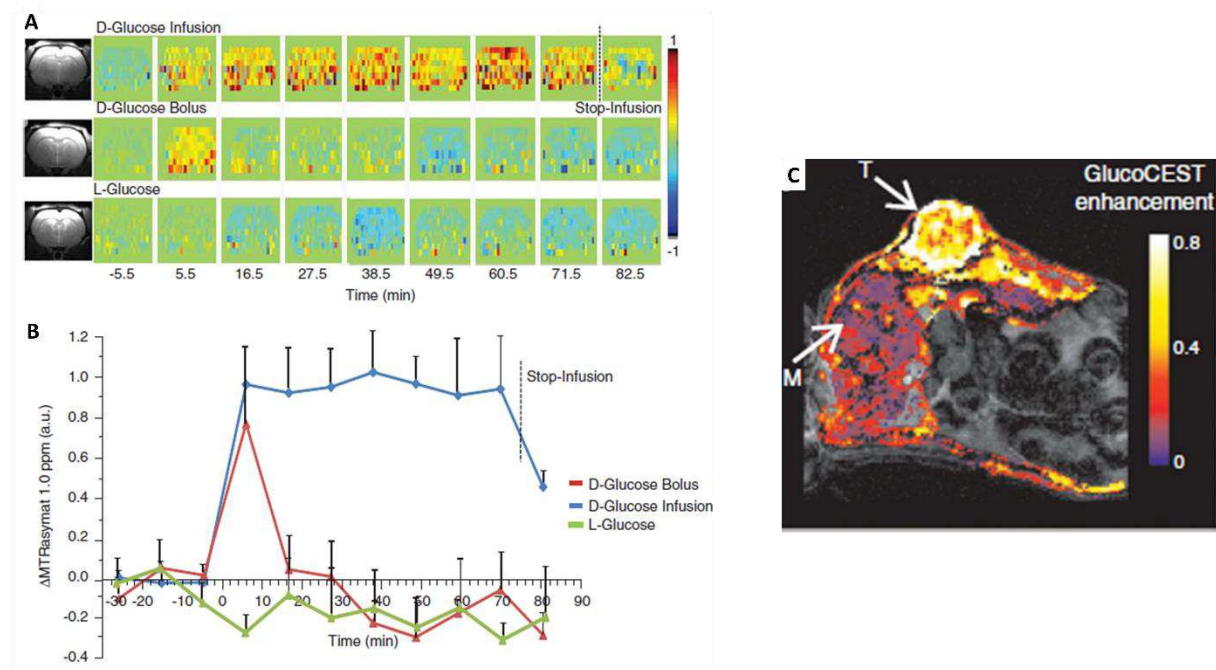


Figure IV.7 :

Exemples d'application de l'imagerie glucoCEST.

A et B montrent l'évolution du signal glucoCEST dans le cerveau d'une souris pendant une perfusion de D-glucose (courbe bleue), après injection d'un bolus de D-glucose (courbe rouge) et après injection d'un bolus de L-glucose (courbe verte). (Nasrallah et al., 2013)

C. Démonstration de l'hypermétabolisme de la tumeur par imagerie glucoCEST. Le signal glucoCEST augmente dans la tumeur. (Walker-Samuel et al., 2013)

3. Le myo-Inositol

Le myo-Inositol est un marqueur connu des cellules gliales. De précédentes études en SRM ont montré des altérations de la concentration de ce métabolite dans un bon nombre de désordres neurologiques. La détection du myo-Ins par imagerie CEST (miCEST) offrirait donc la possibilité de cartographier la distribution de ces changements de concentrations afin d'identifier les différentes structures atteintes par la pathologie. Lorsque les neurones souffrent, comme dans les maladies neurodégénératives par exemple, les cellules gliales deviennent réactives et mènent à une augmentation de la concentration de myo-Ins. Du fait de sa résonnance très proche de l'eau (0,6 ppm) et de sa faible concentration *in vivo*, la détection du myo-inositol reste très difficile et est encore source de débat au sein de la communauté. Néanmoins, quelques études ont été réalisées sur des modèles souris de la maladie d'Alzheimer (APP-PS1) démontrant une augmentation du contraste miCEST chez les souris APP comparé aux contrôles (Haris et al., 2011, 2013b).

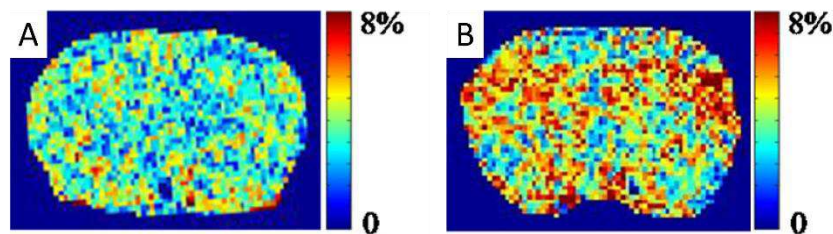


Figure IV.8 :

Application de l'imagerie miCEST à un modèle souris de la maladie d'Alzheimer : l'APP-PS1 (Haris et al., 2013).

- A.** Image miCEST d'une souris contrôle.
- B.** Image miCEST d'une souris Alzheimer.

Le signal miCEST est plus élevé chez les souris Alzheimer traduisant probablement une augmentation de myo-Inositol reflétant une altération des tissus.

4. Le glycosaminoglycane

Et pour finir, l'imagerie CEST des protons hydroxyles permet également d'étudier le métabolisme du glycosaminoglycane. Cette molécule est un élément essentiel de la formation du cartilage. Dans des pathologies telles que l'arthrose, la concentration de ce métabolite est altérée. Par conséquent, l'application de l'imagerie gagCEST (acronyme pour l'imagerie CEST du glycosaminoglycane) apporte des informations corrélées à l'imagerie du Sodium ^{23}Na (Schmitt et al., 2011) habituellement utilisée pour le diagnostic de ce type de pathologie avec une meilleure résolution spatiale et une plus grande quantité de signal. Cette modalité CEST a été appliquée au genou, à la cheville et également sur des disques intervertébraux reliant la diminution du signal gagCEST à la dégénérescence du cartilage (Kim et al., 2011; Saar et al., 2012).

D. Gène rapporteur

Au cours des dernières décennies, de nombreuses thérapies ont été explorées pour tenter de soigner les pathologies et notamment les maladies cérébrales. La thérapie génique par exemple est une approche intéressante qui consiste à remplacer ou corriger les gènes défectueux impliqués dans le développement des symptômes de la maladie. Pour se faire, les gènes thérapeutiques sont insérés dans les cellules affectés au moyen de vecteurs viraux adéno-associés (AAV – (Carter, 2005)) ou de rétrovirus (lentivirus – (Trono, 2000)). En 2007, l'équipe de Peter van Zijl a proposé d'utiliser l'imagerie CEST afin de pouvoir vérifier l'expression d'un gène *in vivo* en tirant avantage de la bonne résolution spatiale de cette modalité. Dans cette étude, des cellules cancéreuses exprimant un gène codant une protéine riche en Lysine (poly-L-lysine) et des cellules contrôles exprimant l'EGFP sont injectées dans chaque hémisphère d'un cerveau de souris *in vivo*. Les cellules vont créer une tumeur dans chaque hémisphère, une exprimant la LRP (pour lysine-rich protein) et l'autre exprimant l'EGFP. Puis, en appliquant une saturation aux alentours de 3,76 ppm (fréquence de saturation des protons de la poly-L-lysine), l'image CEST résultante montre une augmentation du contraste dans l'hémisphère contenant la tumeur exprimant LRP (**Figure III.9**). Ainsi, l'imagerie CEST des protons amides de la lysine permet de pister un type cellulaire spécifique avec un agent de contraste non-toxique et biodégradable ce qui ouvre des perspectives intéressantes aux applications cliniques.

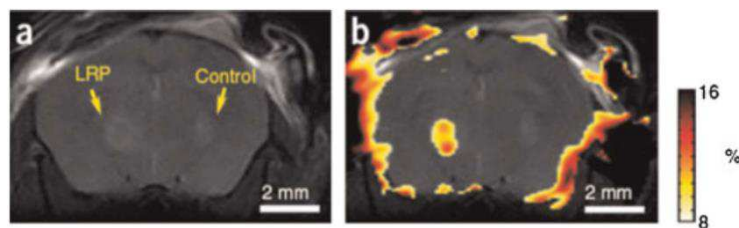


Figure IV.9 : Détection de l'expression de la poly-L-lysine (LRP) *in vivo* dans une tumeur cérébrale par imagerie CEST (Gilad et al., 2007)

- a. Les cellules cancéreuses exprimant la LRP sont injectées dans l'hémisphère gauche et celles exprimant l'EGFP dans l'hémisphère droit.
- b. La tumeur exprimant la LRP est détectée par imagerie CEST.

Plus tard, McMahon et al. (2008) ont développé d'autres polypeptides visualisables par imagerie CEST impliquant d'autres échanges de protons (majoritairement amines) liés à la poly-L-arginine et la poly-L-threonine (**figure IV.10**). Cette approche a été proposée afin d'encoder avec des couleurs différentes les protons en échange résonant à des fréquences différentes. La détection de ces différents agents a été démontrée *in vitro* mais demande cependant des développements plus importants pour permettre des applications *in vivo* notamment pour suivre la transfection génique *in vivo* (car pour chacune des applications présentées, la transfection est effectuée sur des cellules *in vitro* pour être ensuite injectées).

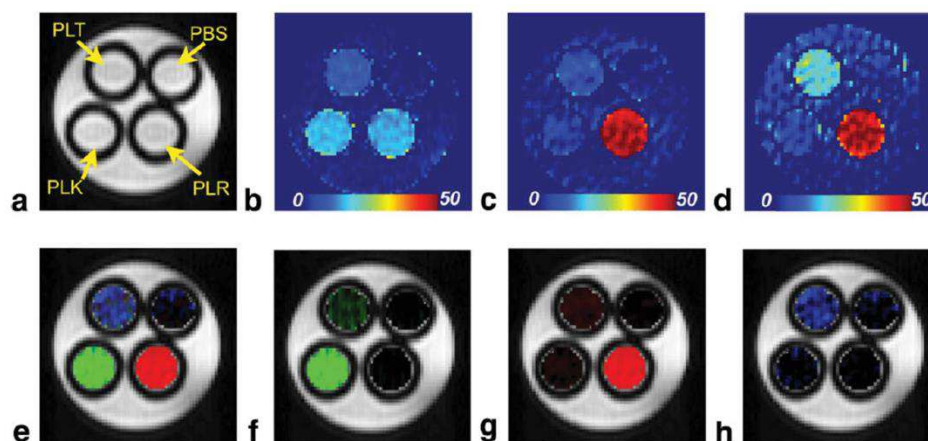


Figure IV.10 :

Détection in vitro de la poly-L-lysine (en vert), de la poly-L-arginine (en rouge) et de la poly-L-threonine (en bleu) par imagerie CEST. (McMahon et al., 2008)

a. Image anatomique. **b.** MTRasym à $\pm 3,7$ ppm. **c.** MTRasym à $\pm 1,8$ ppm. **d.** MTRasym à $\pm 0,8$ ppm. **f.** image CEST des protons $-NH$. **g.** image CEST des protons $-gNH_2$ (guanine). **h.** image CEST des protons $-OH$. **e.** Fusion de toutes les images CEST.

Chapitre V : Développement de l'imagerie CEST à MIRCen

Dans ce chapitre, nous présenterons l'environnement technique utilisé pour mener à bien l'ensemble des expériences durant cette thèse. Nous présenterons également les détails méthodologiques de la séquence CEST développée ainsi que l'optimisation des paramètres d'acquisition pour rendre la séquence CEST spécifique à certains métabolites ou certaines propriétés physico-chimiques du milieu.

I. Imagerie CEST à haut champ magnétique

A. Hardware

Les travaux de cette thèse ont été réalisés sur un scanner IRM horizontal Bruker (Ettlingen, Allemagne) disposant d'un aimant de 11,7 Teslas et de diamètre interne de 16 cm (**Figure V.1a**) dédié à l'imagerie des rongeurs. La fréquence de résonance propre du système pour le proton est donc de 500,3 MHz. Le scanner IRM est piloté par le logiciel ParaVision 6.0.1 développé par l'entreprise Bruker et est également doté d'un gradient de champ ayant une intensité maximale de 752 mT/m et de diamètre interne de 9 cm.

Trois antennes ou combinaison d'antennes ont été utilisées durant cette thèse :

- Les études réalisées sur le rat ont été effectuées à l'aide de la combinaison d'une antenne volumique en transmission (T_x) de diamètres interne et externe respectifs de 72 et 89 mm (**Figure V.1b**) et d'une antenne de surface en réception (R_x - **Figure V.1d**).
- Les expériences d'imagerie du cerveau entier de la souris ont nécessité l'emploi d'une combinaison d'antennes similaire aux études chez le rat en remplaçant l'antenne de réception par une antenne surfacique adaptée au crâne de la souris (**Figure V.1e**).
- Le laboratoire dispose également d'une antenne de surface cryogénique en quadrature de phase pour la transmission et la réception du signal (**Figure V.1c**). En RMN, le bruit peut être généré par l'échantillon mesuré ou provenir du bruit électronique interne à l'antenne. Ce dernier peut être grandement atténué en abaissant la température du circuit résonant comme c'est le cas pour cette antenne refroidie à l'hélium liquide. Nous avons estimé que cette antenne permettait d'augmenter le rapport signal à bruit (SNR pour Signal-to-Noise Ratio) d'un facteur d'environ 2,5 comparé aux configurations à température ambiante présentées ci-dessus. Cette antenne permet donc d'augmenter très significativement la résolution spatiale des images ou d'améliorer le rapport SNR en spectroscopie ^1H . Cette antenne a été utilisée pour l'acquisition des spectres ^1H ainsi que pour l'imagerie gluCEST haute-résolution dans l'hippocampe.

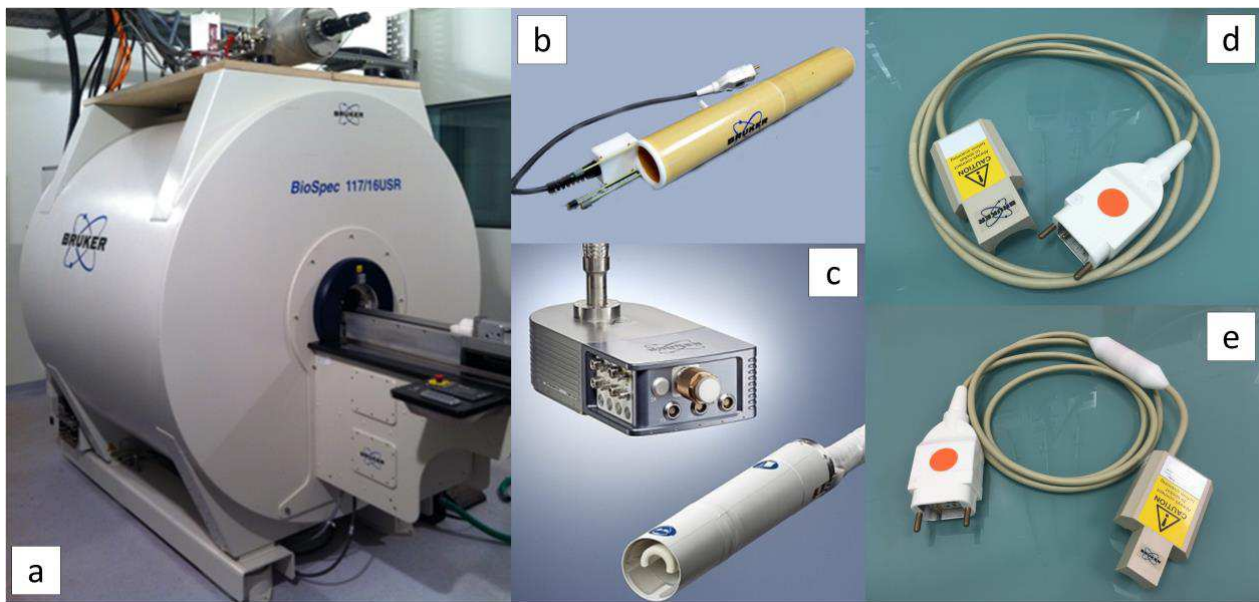


Figure V.1 : Scanner et antennes utilisées au cours de cette thèse.

- a. Scanner IRM 11,7 T Bruker.
- b. Antenne volumique capable de transmettre et réceptionner les ondes RF.
- c. Antenne de surface rat avec un canal de réception seul.
- d. Antenne de surface souris avec un canal de réception seul.
- e. Antenne cryogénique de surface en quadrature de phase effectuant la transmission et réception du signal.

B. La séquence TurboRARE

Comme énoncé précédemment (cf chapitre III), une séquence CEST est constituée d'une séquence d'imagerie classique à laquelle est ajouté un module de préparation de l'aimantation. On parle dans le cas de l'imagerie CEST d'un module de saturation. Les séquences d'échos de spin (SE) sont couramment utilisées dans le cadre d'applications de l'imagerie CEST du fait de leur faible sensibilité aux inhomogénéités de champ B_0 mais ces séquences sont en général relativement longues. On voit cependant de plus en plus d'études utilisant d'autres types de séquences CEST et notamment des séquences d'imagerie basées sur des Gradient-Echos (GRE) (Dai et al., 2014; Dixon et al., 2010) ou EPI (Jiang et al., 2016; Sun et al., 2013) afin de permettre une acquisition plus rapide des images. L'utilisation de ces séquences entraîne néanmoins certains désagréments tels que la sensibilité au B_0 pour les GRE ou les artéfacts de reconstruction pour les EPI.

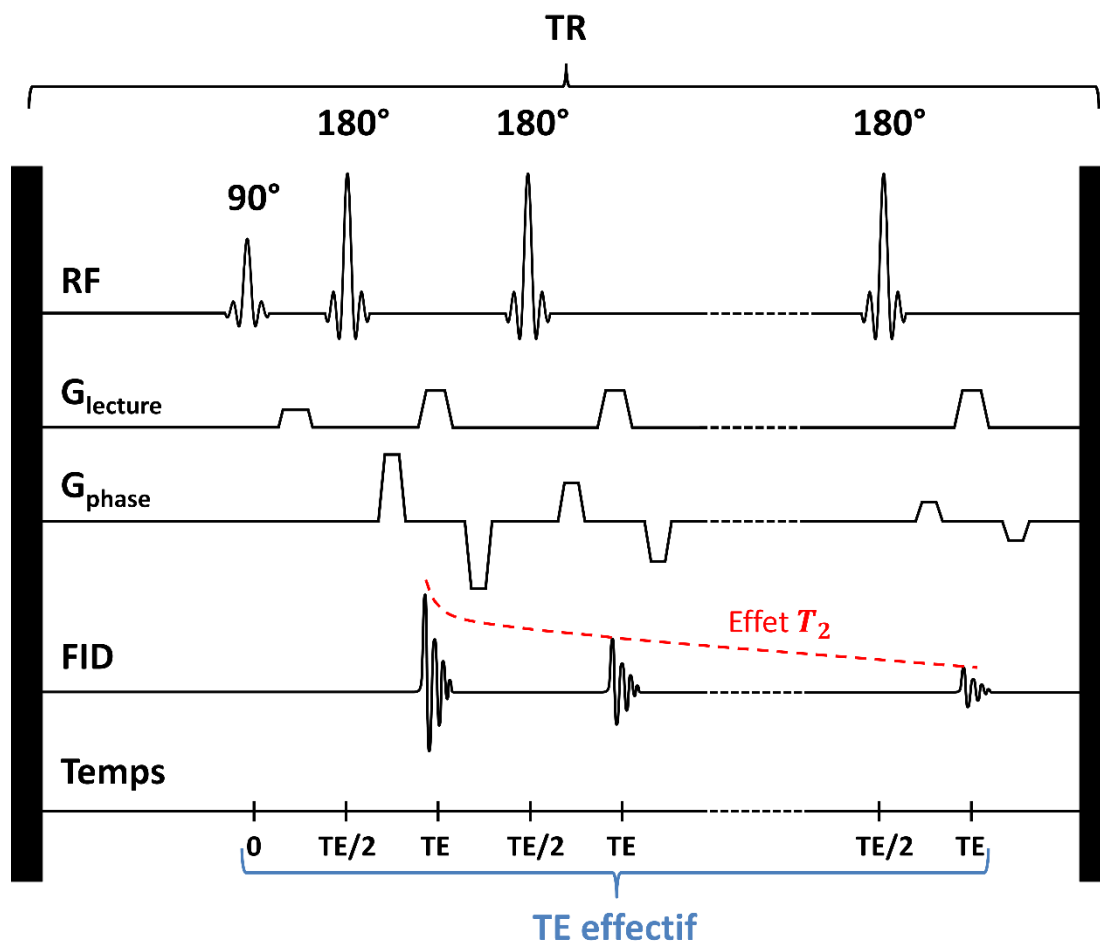


Figure V.2 : Module d'imagerie principalement utilisé durant cette thèse.

Séquence Turbo Spin Echo avec facteur turbo de 10, un temps de répétition (TR) de 5000 ms et un temps d'échos (TE) de 6ms (le TE effectif vaut donc 30 ms).

Le facteur temps n'étant pas primordial pour les travaux de cette thèse, notre choix s'est porté sur une séquence appelée Turbo Spin-Echos (TSE) ou Fast Spin-Echos (FSE). Utilisée pour la première fois en 1986 par Hennig, cette séquence repose sur le principe des échos de spins si ce n'est qu'à la différence des séquences SE classiques, elle se compose d'une série d'impulsions à 180° nommée « train d'échos ». De plus, pour chaque impulsion, la valeur de l'encodage de phase change de manière à permettre l'acquisition d'une nouvelle ligne de l'espace k. La séquence TSE permet donc d'acquérir plusieurs lignes de l'espace k au cours d'un même TR ce qui la rend plus rapide qu'une séquence d'échos de spins traditionnelle. Néanmoins, l'effet T_2 , bien que limité par le train d'échos, est toujours présent : le signal RMN sera moins intense à chaque écho (**Figure IV.2**). Il est donc important de déterminer un nombre d'échos raisonnable pour maintenir un ratio signal à bruit (SNR) élevé : la quantité d'échos est définie par le facteur turbo également appelé longueur de train d'échos ou encore facteur RARE (pour *Rapid Acquisition with Refocused Echos*). Dans le cadre de cette thèse, la séquence est composée de 10 échos soit un facteur turbo égal à 10. Chaque impulsion est séparée par un temps d'échos (TE) de 6 ms ce qui donne un temps d'échos effectif (durée totale des échos) de 30 ms.

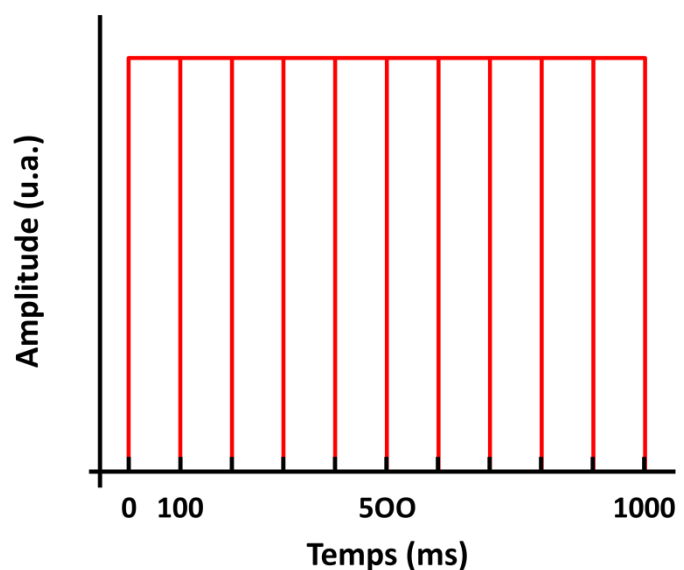
C. Le module de saturation

La saturation des protons d'intérêt est l'étape la plus importante des acquisitions CEST. En théorie, la saturation nécessite l'application d'une impulsion continue d'une durée inversement proportionnelle au taux d'échange des protons labiles. Cependant, particulièrement à haut champ, l'emploi d'une saturation continue peut générer un dépôt d'énergie trop élevé qui peut s'avérer dangereux. De plus, l'onde continue peut être éprouvante pour le matériel (antennes et amplificateurs haute-puissance) à des temps de saturation longs. En conséquence, de nombreuses stratégies ont été explorées pour optimiser la saturation des protons d'intérêt lors des expériences d'imagerie CEST comme l'emploi d'une série d'impulsions courtes appelée aussi train d'échos (Sun et al., 2005) ou en alternant une rapide saturation avec une acquisition d'images courte telle que l'EPI (Jones et al., 2012).

Ainsi, le module de saturation sélective implémenté à MIRCen a été segmenté en une série d'impulsions carrées ou *broad-pulses* de 100 ms et séparées par un intervalle de 20 μ s. Etant donné que le délai inter-impulsion est très court par rapport à la durée d'une impulsion (d'un facteur de 5000), le train d'impulsions peut être assimilé à une impulsion longue et continue. De cette manière, il suffit d'adapter le nombre d'impulsions de saturation n_{pulse} pour appliquer un temps de saturation t_{sat} tel que : $t_{sat} = n_{pulse} \times 100\text{ms}$. Le paramètre n_{pulse} est ainsi réglé pour chaque application CEST afin d'optimiser la détection du groupe de protons d'intérêt. Il est très rare d'appliquer un t_{sat} de plus de 4 s, c'est pourquoi le TR de la séquence a été établi à 5000 ms.

Figure V.3 : Module de saturation de la séquence CEST pour un temps de saturation t_{sat} de 1 s.

Train de dix impulsions de 100 ms avec un intervalle de 20 μ s entre chaque impulsion.



II. Calibration et post-traitement des données CEST

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, l'acquisition d'une image CEST est précédée par une impulsion de saturation émise à une fréquence d'intérêt en fonction du groupe de protons à imager. Les images CEST comportent donc une information fréquentielle qui est essentielle. Cependant, cette information peut être biaisée par les inhomogénéités de champ locales. Il est donc primordial de corriger les données CEST en post traitement. De plus, l'intensité de l'impulsion de saturation est un facteur essentiel car elle permet entre autres de sélectionner certains protons labiles en fonction de leur taux d'échanges. Par conséquent une calibration précise de la puissance des impulsions mises en jeu dans une acquisition CEST est nécessaire. Dans cette partie, nous illustrerons ces différents principes et nous présenterons les routines mises en place pour mettre au point le protocole d'imagerie CEST à haut champ.

A. Correction des inhomogénéités du champ B_0

La correction des inhomogénéités du champ externe B_0 est un problème bien connu dans l'univers de la RMN. Il est effectivement très important que les mesures soient faites avec le champ le plus homogène possible de manière à obtenir une résolution spectrale assez élevée pour pouvoir distinguer les différentes espèces chimiques (notamment pour la spectroscopie). Le scanner IRM est donc équipé de bobines qui ont pour fonction d'homogénéiser le champ B_0 , on parle alors de « shim ». La précision de ce shim peut ensuite être améliorée en effectuant un ajustement local dans un voxel contenant la zone à imager. Malgré tous ces réglages, l'homogénéité du champ B_0 reste imparfaite et on observe alors un décalage de la fréquence de résonance des différents protons.

1. Principe de la correction du B_0 en imagerie CEST

Dans le cas de l'imagerie CEST, la caractérisation du signal se fait de manière asymétrique par rapport à la fréquence de l'eau libre. Si la fréquence de résonance « absolue » de l'eau libre est de 4,7 ppm, elle est par convention référencée à 0 ppm en imagerie CEST. C'est à partir de cette fréquence de référence que les fréquences de résonance propres des différents groupes de protons labiles sont calculées. En présence d'inhomogénéités de champ B_0 , la totalité du Z-spectrum subit un décalage en fréquence qui entraîne un calcul incorrect du MTRasym car non centré sur la fréquence centrale de l'eau libre. Ces variations sont d'autant plus importantes lorsque la fréquence de résonance du groupe de proton étudié est proche de la fréquence de l'eau libre comme c'est le cas des protons hydroxyles résonnant autour de 1 ppm par rapport à l'eau libre. Généralement, ces inhomogénéités sont corrigées par une méthode appelée WASSR (pour *Water Saturation Shift Referencing* – (Kim et al., 2009)) et consiste à cartographier la distribution de ces inhomogénéités (carte de B_0) pour ensuite les rectifier directement sur l'image CEST en post-traitement.

En pratique, cette technique consiste tout d'abord à acquérir un Z-spectrum autour de la fréquence de l'eau avec une résolution fréquentielle élevée (inférieure à 0.1 ppm) en appliquant une saturation

de très faible intensité. Ainsi, seuls les protons de l'eau libre seront sensibles à la saturation et les images ne seront pas contaminées par des effets de saturation des protons endogènes (**Figure IV.4a**). Puis, une fois acquis, le Z-spectrum du WASSR est interpolé (**Figure IV.4b**) à l'aide d'une fonction spline cubique (polynômiale par morceau) de façon à définir la position exacte du pic correspondant à la saturation directe de l'eau libre, repérée par le minimum absolu. De cette manière, la mesure pixel par pixel du décalage entre le minimum absolu et la fréquence de référence centrée sur 0 ppm permet de générer une carte de champ B_0 absolue. Cela permet de recentrer le pic sur la fréquence de l'eau libre par une simple translation du Z-spectrum (**Figure IV.4c**). Etant donné que le décalage fréquentiel est constant (dans l'hypothèse où l'animal n'a pas bougé), l'écart mesuré à l'aide du Z-spectrum du WASSR est reporté sur le Z-spectrum d'intérêt qui se trouve ainsi corrigé des artéfacts de champ B_0 et les points interpolés sont supprimés du Z-spectrum corrigé (**figure IV.4d**).

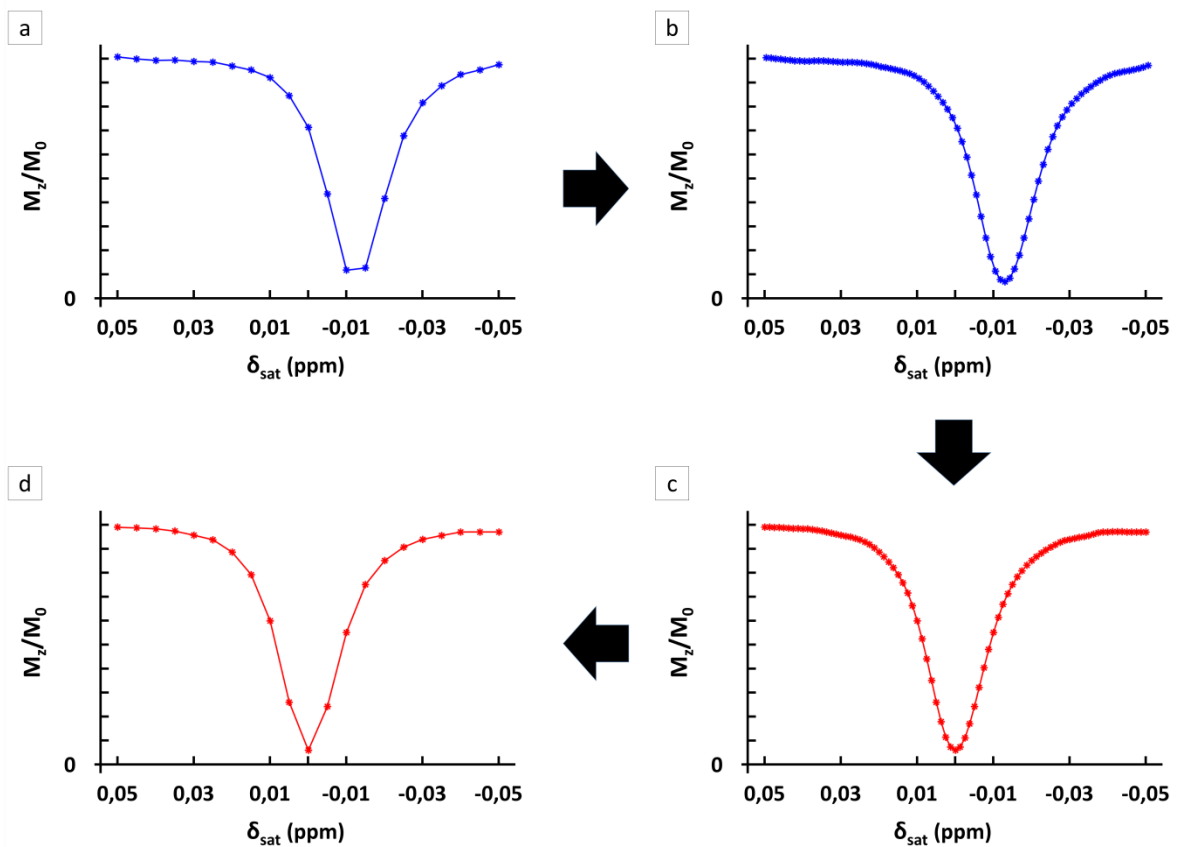


Figure V.4 : Méthode WASSR de correction des inhomogénéités de champ B_0 .

- e. Acquisition d'un Z-spectrum correspondant à la saturation de l'eau libre seule.
- f. Interpolation du Z-spectrum de manière à repérer la fréquence exacte du minimum absolu correspondant à la fréquence de l'eau libre.
- g. Correction du décalage fréquentielle du spectre qui est recentré à la fréquence de l'eau libre.
- h. Z-spectrum corrigé après suppression des points interpolés.

2. Démonstration de la méthode de correction sur un fantôme de glucose

Comme mentionné dans le chapitre **IV**, la fréquence de saturation des protons hydroxyles de la molécule de glucose est proche de la fréquence de résonance de l'eau libre (environ 1 ppm de différence). Dans cette situation, la correction des inhomogénéités est primordiale pour la quantification de l'effet CEST. Dans le but d'appliquer notre méthode de correction WASSR, nous avons donc acquis un Z-spectrum avec une saturation d'une intensité de 0,2 μ T sur un fantôme de glucose composé de huit solutions de glucose de concentrations respectives de 0 mM, 1 mM, 3 mM, 6 mM, 12 mM, 25 mM, 50 mM et 100 mM placées dans du gel d'agarose à 10 % (**Figure V.5a**).

L'acquisition WASSR a donc permis de générer la carte des variations du champ B_0 dans le fantôme (**Figure V.5b**) et ainsi effectuer la correction pixel à pixel. Nous avons ensuite mesuré les Z-spectra moyens dans les pixels correspondant à chaque solution avant et après correction. Si on prend l'exemple de la solution concentrée à 50 mM présenté sur la **Figure V.5c**, on observe bien un décalage entre le Z-spectrum avant (courbe bleue) et après (courbe rouge) correction par la méthode WASSR. On peut aussi remarquer l'impact de ces inhomogénéités sur le calcul du MTRasym dont l'effet est anormalement négatif avant la correction. Comme on peut le voir sur la **Figure V.5c**, la technique du WASSR permet de supprimer cet artéfact et amène à une meilleure quantification de l'effet CEST.

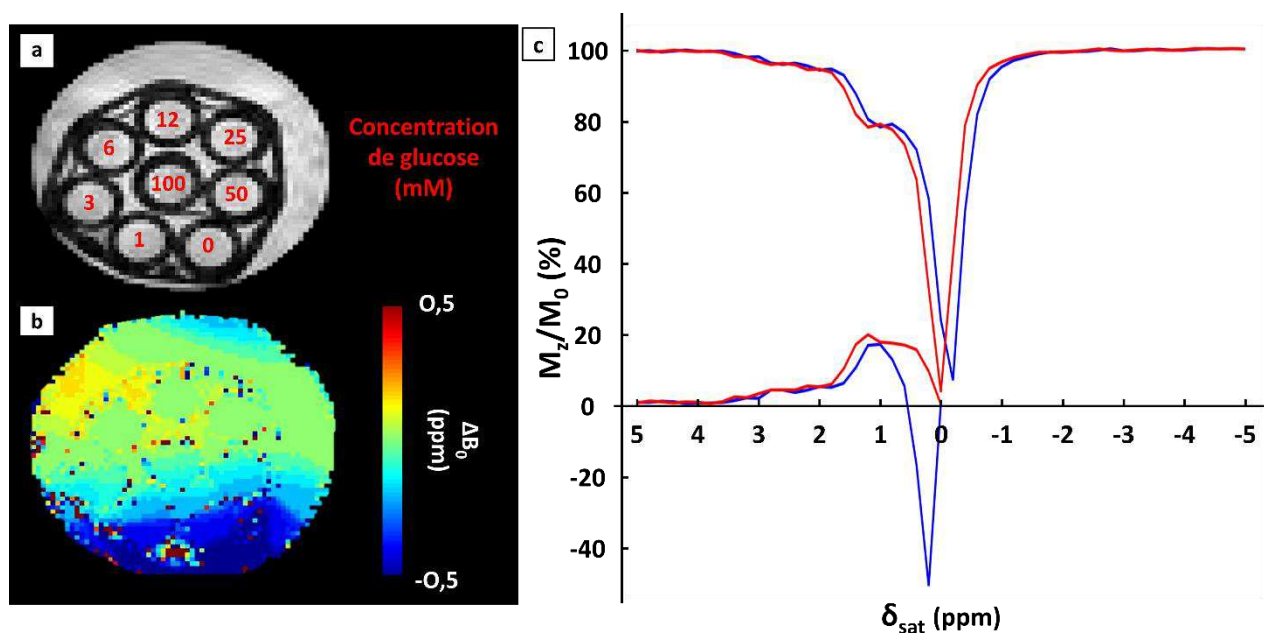


Figure V.5 : Correction des inhomogénéités du champ B_0 dans un fantôme de glucose.

- Image anatomique d'un fantôme de glucose contenant des solutions de glucose de 0, 1, 3, 6, 12, 25, 50 et 100 millimolaires placées dans du gel d'agarose à 10 %.
- Carte des inhomogénéités du champ B_0 dans le fantôme.
- Z-spectrum et MTRasym avant (bleu) et après (rouge) correction acquis sur la solution de glucose de concentrée à 50 mM.

3. Intérêt de la correction des inhomogénéités du champ B_0 *in vivo*

La correction des inhomogénéités de champ B_0 est également nécessaire *in vivo*. En effet, l'imagerie *in vivo* est beaucoup plus complexe que dans un fantôme homogène car le cerveau est entouré de différentes structures hétérogènes telles que les muscles, les vaisseaux sanguins, le crâne ou les cavités auditives. La correction des inhomogénéités de champ B_0 est donc primordiale pour s'assurer que les données CEST ne sont pas corrompues. Un exemple d'acquisition WASSR *in vivo* est présenté sur la **figure V.6a**. Chaque image représente le signal de l'eau libre mesuré après une saturation de $0,2 \mu\text{T}$ appliquée à la fréquence mentionnée dans le coin supérieur gauche (en ppm). Au préalable, un shim localisé est réalisé dans le voxel vert (**Figure V.6b**) grâce à la procédure Mapshim du logiciel ParaVision. On constate sur l'image acquise avec une fréquence de saturation centrée sur 0 ppm que seuls les protons présents dans le voxel homogénéisé par le Mapshim sont complètement saturés. A cause des inhomogénéités de B_0 importantes au niveau des conduits auditifs (dus à l'interface tissu/air), les protons situés dans le bas du cerveau ont une fréquence de résonance décalée de quelques fractions de ppm. Grâce à l'analyse décrite ci-dessus, il est donc possible de cartographier ces écarts de champ B_0 par rapport à la fréquence de référence (**Figure V.6c**).

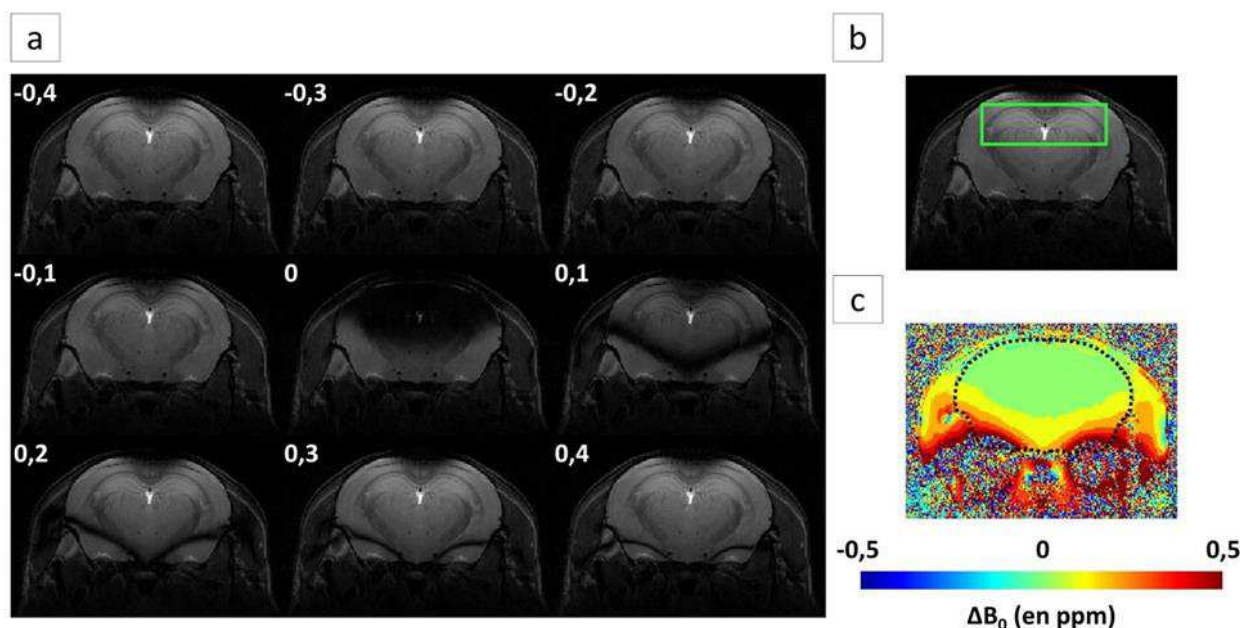


Figure V.6 : Acquisition WASSR dans le cerveau d'une souris.

- a. Images WASSR acquises de -0,4 ppm à 0,4 ppm en appliquant une saturation de $0,2 \mu\text{T}$ pendant 500 ms.
- b. Voxel dans lequel la procédure Mapshim est effectuée.
- c. Carte des variations du champ B_0 dans le cerveau de la souris.

Cette correction se révèle indispensable pour les applications CEST dédiées à l'imagerie des protons hydroxyles et aux applications endogènes de manière générale. Cependant, dans le cas d'une espèce résonnant à des fréquences éloignées de celle de l'eau libre (supérieures à ± 5 ppm), la correction par le WASSR peut s'avérer superficielle.

Les Z-spectra présentés dans ces travaux de thèse ont été systématiquement corrigés par le WASSR en appliquant une saturation de 0,2 μT pendant 500 ms et généralement sur une gamme de fréquence allant de -0,5 à 0,5 ppm (par rapport à l'eau) avec un pas de 0,05 ppm.

B. Importance de la calibration du B_1

L'intensité de l'impulsion de saturation est un paramètre essentiel à prendre en compte lors de la mise au point d'un protocole d'imagerie CEST. Chaque molécule est caractérisée par la nature des protons qu'elle échange ainsi que par la vitesse d'échange de ces protons avec l'eau libre. La sensibilité à ce taux d'échanges (k_{ex}) dépend de l'intensité du B_1 : plus elle est élevée, plus on sera sensible à un régime d'échange rapide. Cependant, la puissance ne doit pas être trop forte afin de limiter les effets de la saturation directe des protons de l'eau.

D'après la relation (III.32) décrite dans le chapitre III, on constate que l'intensité optimale de l'impulsion pour saturer sélectivement une espèce de protons dépend de leur taux d'échanges avec l'eau libre ($k_{BA} = 2\pi\gamma B_{1opt}$). La détermination de l'intensité optimale pour le B_1 peut donc être réalisée théoriquement si l'on connaît le taux d'échange des protons en question. En pratique, une détermination expérimentale consistant à mesurer la dépendance de l'effet CEST avec l'intensité du B_1 s'avère souvent plus aisée et très robuste.

Pour cartographier la distribution de protons d'intérêt dans le cerveau entier, il est donc nécessaire d'appliquer un B_1 homogène afin de saturer de façon efficace et homogène les protons de la coupe. Néanmoins, l'efficacité peut dépendre du profil de sensibilité de l'antenne utilisée pour la transmission de l'impulsion RF.

1. Cas d'une antenne volumique

Les antennes volumiques, comme leur nom l'indique, permettent de placer l'animal ou l'échantillon en son centre. Cette disposition a pour but de faire en sorte que la puissance délivrée soit identique dans tout l'échantillon. Afin de vérifier cette affirmation dans le cadre de nos expériences, nous avons cartographié les variations du B_1 dans un cerveau de souris en utilisant la méthode des angles doubles (Cunningham et al., 2006; Stollberger and Wach, 1996). Cette méthode consiste à acquérir deux images avec des angles de bascule différents : l'un valant le double de l'autre. Il faut également pour cela utiliser un temps de répétition très long pour ne pas ajouter de pondération T_1 dans la mesure. Le coefficient B_{1rel} , correspondant à la variation entre le B_1 appliqué et le B_1 désiré (B_{1ref}), est ensuite calculé selon la relation suivante :

$$B_{1rel} = \frac{B_1}{B_{1ref}} = -\frac{1}{\gamma\tau} \cos^{-1} \left(\frac{I_2}{2I_1} \right) \quad (\text{V.1})$$

avec

B_{1rel} , sans unité,

I_1 , le signal mesuré pour un angle de bascule α ,

I_2 , le signal mesuré pour un angle de bascule de 2α et

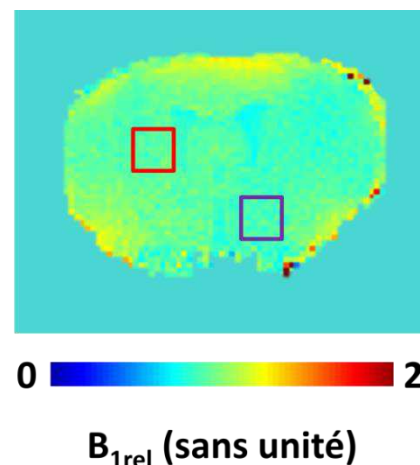
τ , la durée de l'excitation en s.

De ce fait, pour un champ d'excitation parfaitement homogène, la valeur du coefficient B_{1rel} sera égale à 1. Des études ont tenté de proposer des approches permettant de corriger les inhomogénéités de B_1 qui peuvent être majeures dans le cas des grandes antennes volumiques cliniques à haut champ magnétique où la longueur d'onde des impulsions RF est plus petite que la taille du cerveau (Singh et al., 2013). Toutefois, cette correction linéaire n'est qu'une estimation par interpolation de la valeur l'effet CEST mesuré. En effet, en présence d'une saturation inhomogène, il existe une dépendance spatiale en fonction de la position du voxel r . Par conséquent, le signal CEST mesuré est la somme de l'ensemble des contributions des protons ayant été saturés avec une intensité $B_1(r)$. Une telle correction en post-traitement n'est donc qu'une correction linéaire du biais induit par le B_1 mais ne permet pas de prendre en compte l'efficacité de la saturation. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'une correction de l'effet CEST. La méthode la plus propre pour la correction du B_1 serait de résoudre pixel-à-pixel les équations de Bloch présentées dans le chapitre III en utilisant la valeur effective du B_1 mesuré en un pixel donné $B_1(r)$. Cette approche n'a pas été utilisée dans cette thèse car le champ B_1 a été jugé suffisamment homogène avec l'antenne de transmission volumique (voir ci-après).

L'utilisation de cette méthode est malgré tout intéressante pour attester de la robustesse des mesures effectuées car, grâce à l'excellente résolution spatiale de l'IRM, elle permet de cartographier précisément les variations du champ B_1 dans l'échantillon (carte de B_1). Pour évaluer les inhomogénéités de B_1 générées par notre antenne volumique, nous avons donc appliqué cette méthode dans le cerveau de la souris en acquérant des images avec des angles de bascules respectifs de 60° et 120° . Nous obtenons ainsi la carte de variations de B_1 présentée sur la **figure V.7**. Nous avons ensuite comparé le coefficient B_{1rel} moyen dans deux régions du cerveau (délimitées en rouge et violet sur la **figure V.7**) et obtenu les valeurs suivantes : 0,996 pour la région encadrée en rouge et 0,992 pour la région encadrée en violet. De plus la valeur moyenne du coefficient B_{1rel} dans le cerveau entier est de $0,99 \pm 0,02$, ce qui montre bien que le B_1 délivrée par l'antenne volumique est homogène et ne nécessite donc pas de correction ultérieure concernant ce paramètre.

Figure V.7 : Cartographie des inhomogénéités du champ d'excitation B_1 délivré par l'antenne volumique du laboratoire dans le cerveau de la souris.

Le B_1 délivré par l'antenne est relativement homogène comme on peut le voir avec les coefficients B_{1rel} moyens calculés dans les régions d'intérêt délimitées par les cadres rouge et violet de valeurs respectives : 0,996 et 0,992.



Pour étudier l'influence de ces variations de puissance sur l'effet CEST, nous avons scanné un fantôme composé de différents tubes contenant chacun la même solution de glutamate de concentration 50 mM et de valeur de pH égale à 7. Les tubes sont disposés les uns au-dessus des autres de manière à ce que chacun soit placé à une distance différente de l'antenne. Nous avons effectué une acquisition gluCEST à l'aide d'une antenne volumique puis en utilisant l'antenne cryogénique afin de comparer les effets CEST mesurés. A noter que la fréquence de résonance du glutamate est très sensible aux variations de pH : par conséquent, pour un pH de 7, le glutamate ne résonnera pas à 3 ppm mais plutôt aux alentours de 1,2 ppm (Cai et al., 2012).

Ainsi, lorsqu'on effectue une acquisition gluCEST avec l'antenne volumique sur ce fantôme, nous obtenons les Z-spectra présentés sur la **Figure V.8b** et les MTRasym présentés sur la **Figure V.8c**. On remarque que le profil obtenu dans chacun des 3 tubes est très similaire (courbes verte, orange et violette pour les tubes 1, 2 et 3 respectivement - **Figure V.8**) donc les courbes sont pratiquement superposables. On constate néanmoins un léger décalage fréquentiel du maximum de l'effet gluCEST mesuré (environ 1,5 ppm) par rapport aux valeurs de la littérature (1,2 ppm – (Cai et al., 2012)) qui peut s'expliquer par la dépendance de l'effet CEST à la température. En effet, notre acquisition a été effectuée à température ambiante (21°C) alors que les études sur fantôme de la littérature ont été faites à 37°C.

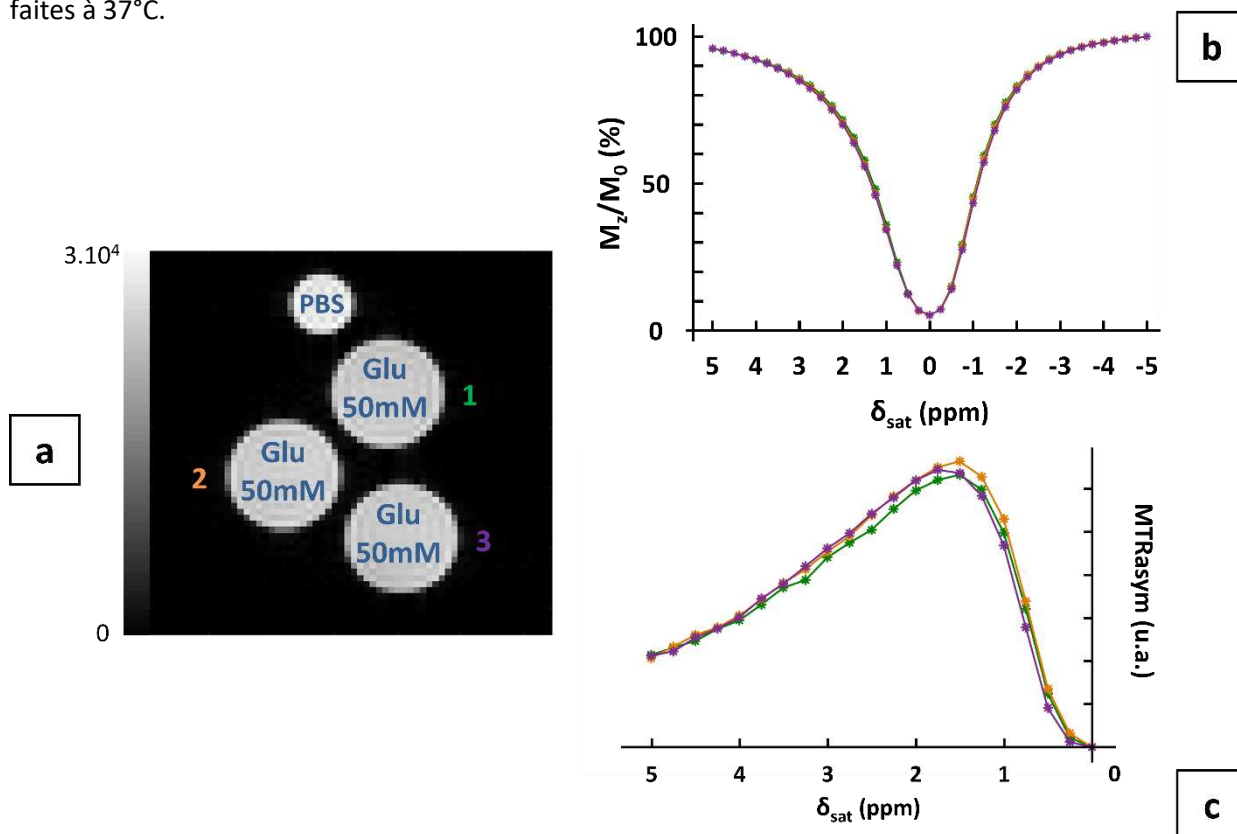


Figure V.8 : Exemple d'acquisition gluCEST avec l'application d'un B_1 homogène sur un fantôme de glutamate composé de trois solutions concentrées à 50 mM.

Les résultats relatifs aux tubes 1, 2 et 3 sont définis respectivement par les couleurs verte, orange et violette.

- a. Images anatomiques acquises avec l'antenne volumique.
- b. Z-spectra mesuré pour chaque tube sur une gamme de fréquence allant de -5 à +5 ppm par rapport à la fréquence de l'eau libre.
- c. MTRasym calculés pour chaque tube.

Nous avons donc démontré que l'antenne volumique délivre un B_1 homogène dans une zone couvrant largement le cerveau des animaux. Elle est par conséquent tout à fait adaptée aux applications CEST et c'est pourquoi, pour les études sur le cerveau entier, nous utiliserons systématiquement l'antenne volumique en transmission.

2. Cas d'une antenne surfacique

En cas d'utilisation d'une antenne de surface telle que l'antenne cryogénique, la transmission du B_1 n'est pas homogène. En effet, malgré sa sensibilité accrue, la puissance transmise par l'antenne cryogénique varie dans l'espace : plus on s'en écarte, plus la puissance délivrée diminue. Ainsi, si on compare les effets CEST obtenus sur le même fantôme contenant 3 tubes de glutamate à 50 mM (**Figure V.9a**), on remarque que les profils de saturation diffèrent pour chaque tube : à cause du B_1 inhomogène, la saturation est moins intense à mesure qu'on s'éloigne de l'antenne. Cette réduction de B_1 se traduit par une diminution de la largeur du pic principal des Z-spectra comme on peut le voir sur la **figure V.9b**.

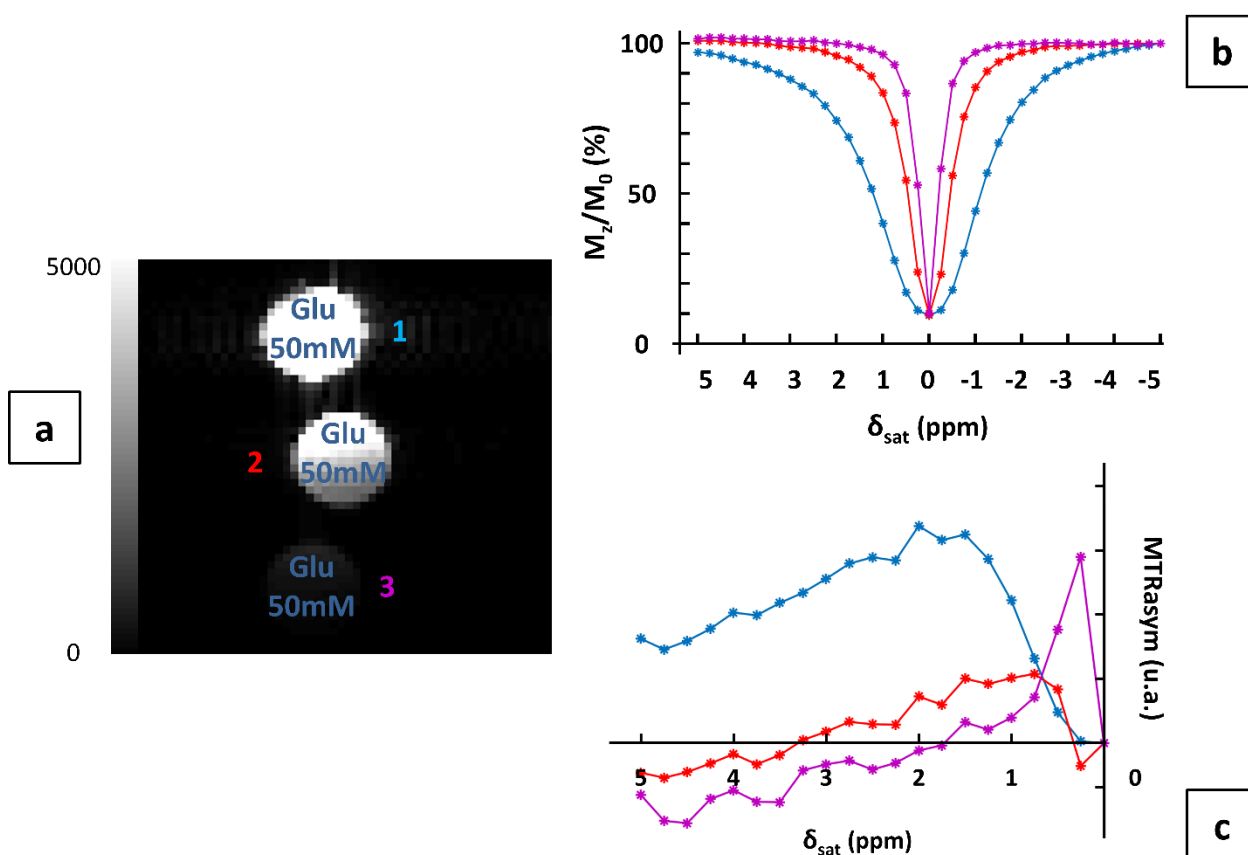


Figure V.9 : Influence de l'application d'un B_1 inhomogène sur les acquisitions d'imagerie gluCEST d'un fantôme de glutamate composé de trois solutions concentrées à 50 mM.

Les résultats relatifs aux tubes 1, 2 et 3 sont définis respectivement par les couleurs bleue, rouge et rose.

- a. Images anatomiques acquises avec l'antenne cryogénique.
- b. Z-spectra mesuré pour chaque tube sur une gamme de fréquence allant de -5 à +5 ppm par rapport à la fréquence de l'eau libre.
- c. MTRasym calculés pour chaque tube.

De plus, le calcul des effets MTRasym correspondant à chacun des Z-spectra (**Figure V.9c**) montrent bien que la détection du glutamate varie selon les tubes. Le tube le plus proche de l'antenne (courbe bleue de la **figure V.9c**) semble avoir un profil similaire à ceux observés avec l'antenne volumique (**Figure V.8**) alors que pour les autres, la sensibilité aux échanges rapides du glutamate est plus réduite due à l'inhomogénéité de B_1 .

L'utilisation de l'antenne cryogénique nécessite un étalonnage préalable de la puissance à fournir lors d'une expérience afin de ne pas trop solliciter les composants électroniques de l'antenne et risquer de l'endommager. Cette calibration permet ainsi de rendre le B_1 relativement homogène localement dans une coupe pouvant aller jusqu'à 3 mm et qui peut être définie par l'utilisateur. Lors de l'acquisition présentée en **figure V.9**, la puissance était calibrée dans une coupe contenant le tube numéro 1, le plus proche de l'antenne (**Figure V.9a**) ce qui explique la mesure d'un effet MTRasym de la forme attendue pour cette solution.

A partir de cette observation, une autre acquisition a été faite en calibrant la puissance dans une coupe contenant le second tube. Le profil de saturation et le signal CEST correspondants s'avèrent être similaires à ceux reportés pour le tube n°1 lors de l'acquisition antérieure. De plus, la comparaison avec le contraste CEST mesuré pour l'antenne volumique (**Figure IV.10**) montre qu'on est bien sensible au glutamate. On notera toutefois un effet CEST sensiblement différent pour les acquisitions par antenne cryogénique. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en réalité, la puissance délivrée « en haut » de la coupe de calibration ne sera pas exactement la même qu'« en bas » de la coupe entraînant une saturation moyenne (dans la coupe) d'une valeur légèrement différente à celle désirée. La différence peut également s'expliquer par la variation de température entre les deux acquisitions : la tête de l'antenne cryogénique est maintenue à 38°C alors que l'antenne volumique est à température ambiante (environ 20°C), le fantôme subit donc probablement des changements de température liés à l'antenne utilisée. Or les variations de température ont une influence sur les taux d'échanges et, par conséquent, sur l'effet CEST.

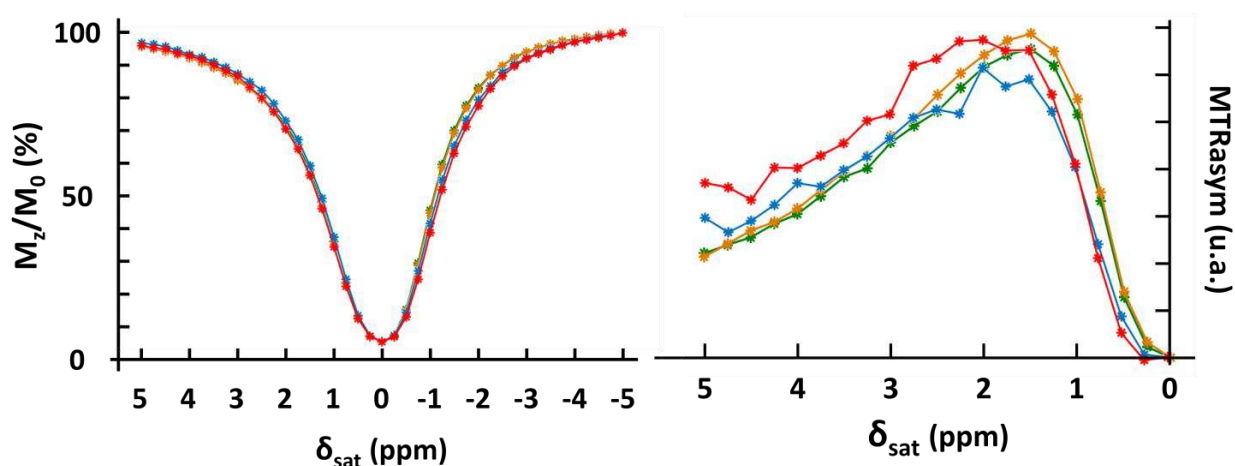


Figure V.10 : Z-spectra et MTRasym acquis avec l'antenne volumique (courbes orange et verte) et avec l'antenne de surface (courbes rouge et bleue).

Lorsque la puissance est correctement calibrée avec l'antenne surfacique, on obtient une saturation similaire à l'antenne volumique. Le CEST est donc possible avec une antenne de surface.

En conclusion, l'emploi de l'antenne cryogénique ne permet pas d'appliquer l'imagerie CEST dans le cerveau entier. En revanche, il est possible de tirer avantage du très bon SNR de cette antenne pour faire de l'imagerie CEST de très haute résolution centrée sur une coupe d'intérêt parallèle à l'antenne. Cette configuration peut être appliquée à l'étude d'une structure en particulier comme nous l'avons fait pour cartographier la distribution de glutamate dans l'hippocampe de la souris dont les résultats seront présentés dans le chapitre **IX**.

III. Imagerie métabolique et physiologique par IRM-CEST

Comme nous l'avons présenté dans les chapitres précédents, l'étude du métabolisme cérébral est un axe de recherche majeur du laboratoire. Dans ce cadre-là, il est particulièrement intéressant de pouvoir cartographier *in vivo* certains métabolites ou paramètres physiologiques directement impliqués dans des processus biologiques. L'imagerie CEST est pour cela un outil de choix car, en paramétrant finement le module de saturation, il est possible d'imager sélectivement certains protons labiles caractéristiques de molécules d'intérêt. C'est le cas notamment du glucose qui est la source d'énergie principale des cellules mais également du glutamate qui est un des principaux neurotransmetteurs du cerveau et est considéré comme un marqueur de l'altération des cellules neuronales, mais est aussi impliqué dans des mécanismes importants du métabolisme cérébral. De même, l'imagerie CEST permet d'être sensible à des variations physiologiques du milieu telles que le pH ou la température. Nous présenterons ici les développements méthodologiques réalisés afin de pouvoir mesurer spécifiquement ces métabolites ou paramètres physiologiques.

A. Développement de l'imagerie gluCEST

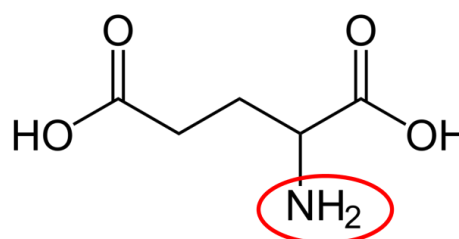
Le glutamate est un biomarqueur intéressant pour l'étude des maladies neurodégénératives (cf chapitres **II** et **IV**). Les altérations du métabolisme du glutamate peuvent traduire une souffrance des cellules neuronales et/ou une modification du métabolisme énergétique. De telles altérations sont en général omniprésentes dans les maladies neurodégénératives. La cartographie de la distribution de glutamate dans le cerveau par imagerie CEST permettrait donc d'obtenir des informations intéressantes et utiles à la caractérisation de modèles animaux ainsi qu'à la compréhension des mécanismes altérés dans ces maladies.

1. Caractérisation de l'effet gluCEST

L'imagerie gluCEST permet de détecter les protons amines ($-\text{NH}_2$) labiles du glutamate (**Figure V.11**). Dans la littérature, le glutamate est connu pour avoir un régime d'échanges rapide et une très forte sensibilité au pH. En conséquence, la fréquence de résonance du glutamate va varier en fonction de la valeur du pH. Pour un pH physiologique (entre 6 et 7,4 – (Cai et al., 2012)), la fréquence centrale de l'effet gluCEST sera située entre 2 et 3 ppm. Ainsi, pour quantifier l'effet gluCEST, le signal du MTRasym est généralement intégré entre ces deux fréquences.

Figure V.11 : Représentation de la molécule de glutamate dont les protons $-\text{NH}_2$ (entourés en rouge) sont labiles.

A noter que le glutamate n'est jamais sous cette forme in vivo mais plutôt sous forme ionisée COO^- ou NH_3^+ .



Pour améliorer la détection du Glu, il est nécessaire d'optimiser les paramètres de saturation tels que la puissance de saturation. Nous avons donc comparé le signal gluCEST d'un fantôme contenant une solution de glutamate de pH 6,5 et de concentration 100 mM en faisant varier le B_1 de 1 μT à 11 μT pour un temps de saturation de 1 s (**Figure V.12a**).

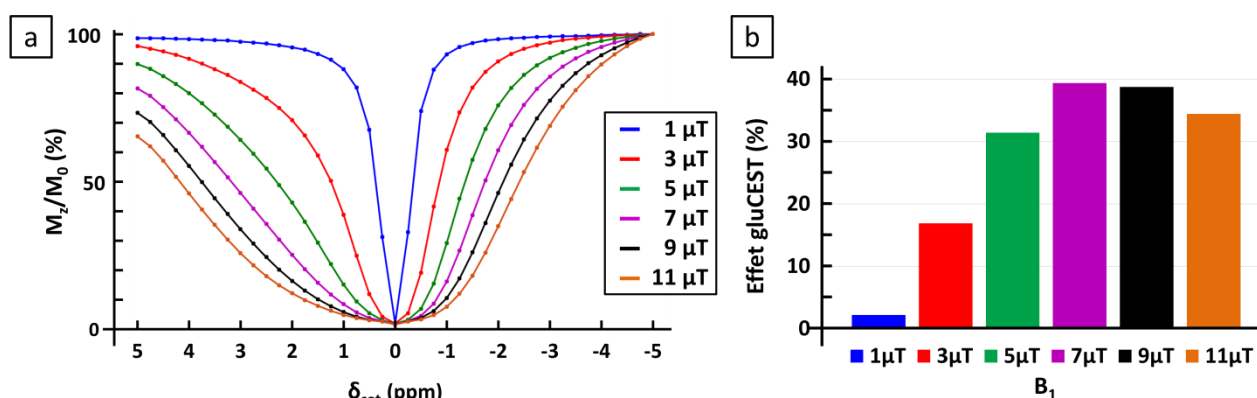


Figure V.12 : Effet gluCEST en fonction de la puissance de saturation (B_1).

Mesure de l'effet gluCEST d'une solution de glutamate concentrée à 100 mM et de pH 6,5 en faisant varier la puissance de saturation de 1 à 11 μT .

- Z-spectra mesurés pour chaque valeur de B_1 .
- Effet MTRasym moyens intégrés entre 2 et 3 ppm pour chaque valeur de B_1 .

Ainsi, l'effet gluCEST augmente avec le B_1 jusqu'à s'atténuer lorsque la puissance devient trop élevée ($> 7 \mu\text{T}$).

On remarque ainsi que le contraste gluCEST augmente avec la puissance de saturation B_1 jusqu'à 7 μ T. Lorsque la puissance devient trop élevée ($> 7 \mu$ T), on observe une réduction du signal CEST (**Figure V.12b**). Cette diminution est en grande partie due à la saturation directe de l'eau libre dont la contribution recouvre peu à peu l'effet gluCEST. Etant donné que la saturation directe semble également contribuer de façon non négligeable à l'effet CEST maximal (mesuré pour une saturation de 7 μ T), nous avons finalement gardé une valeur de B_1 de 5 μ T qui permet également de maximiser le SNR sur les images CEST en réduisant les effets de spillover.

2. Détection du glutamate à haut champ

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le Glu est une molécule échangeant des protons à une fréquence élevée (1000 Hz). Cette particularité, en fonction de l'intensité du champ B_0 , aura donc une conséquence directe sur les conditions d'observation de l'effet gluCEST. Avec l'aide de la société Bruker, nous avons eu l'occasion de tester l'influence de l'intensité du champ B_0 sur la détection du signal gluCEST. Nous avons ainsi observé l'évolution du contraste gluCEST d'un fantôme de glutamate de concentration 100 mM et de pH 7 à différentes valeurs de B_0 : 3 T, 7 T, 9,4 T et 11,7 T (**Figure V.13**).

Comme on peut le voir sur la **figure V.13**, le signal gluCEST mesuré à bas champ est bien moins important qu'à haut champ. On remarque également que la forme du Z-spectrum à 3 T (courbe bleu clair) diffère des trois autres en raison de la faible résolution spectrale qui amplifie l'effet de la saturation directe des protons de l'eau libre.

Ces résultats démontrent l'importance des hauts champs magnétiques pour l'imagerie gluCEST. Si un signal gluCEST reste détectable ici à 3 T avec une concentration de 100 mM, la spécificité du signal serait trop faible pour détecter le glutamate en conditions physiologiques (concentration < 10 mM). C'est actuellement une limitation au transfert clinique de cette technique sur des scanners à bas champ (< 7 T). Néanmoins, avec le développement de plus en plus fréquent de scanners cliniques de 7 T, le transfert reste envisageable à l'avenir. Le potentiel clinique de l'imagerie gluCEST a d'ailleurs déjà été démontré sur le cerveau de patients souffrant de maladies neurodégénératives (Cai et al., 2013) ou encore dans la moelle épinière (Kogan et al., 2013).

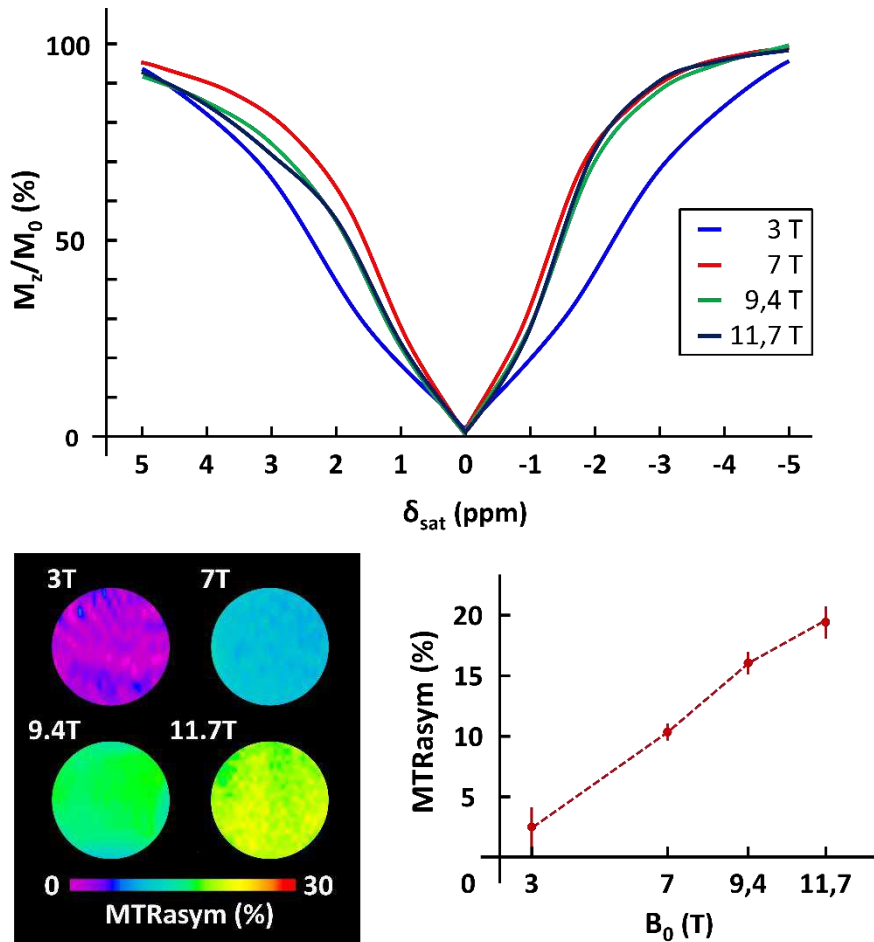


Figure V.13 : Evolution du contraste gluCEST en fonction de l'intensité du champ magnétique extérieur B_0 .

La partie supérieure de la figure montre des Z-spectra caractéristiques d'une acquisition gluCEST pour différentes valeurs du champ B_0 : 3 T (courbe bleu clair), 7 T (courbe rouge), 9,4 T (courbe verte) et 11,7 T (courbe bleu foncé).

La partie inférieure de la figure montre l'effet MTRasym pour chaque valeur de champ. On remarque que la détection du glutamate est plus efficace à haut champ et que l'effet gluCEST est quasiment inexistant à 3 T.

3. Influence du pH sur le contraste gluCEST

Comme le décrit la littérature, la vitesse d'échange des protons du Glu est très sensible aux variations de pH. En effet, la constante de dissociation (pKa) du Glu diffère s'il est sous la forme COO^- ou NH_3^+ , respectivement 2,10 et 9,47 (Voet et al., 2004). Cette particularité aura donc de fortes répercussions sur le taux de protonation de la molécule et par conséquent sur le signal gluCEST. Cette caractéristique a d'ailleurs été exploitée dans le cadre d'expériences d'imagerie gluCEST chez le rat présentant une ischémie cérébrale. (Cai et al., 2012). Nous avons donc décidé d'évaluer cette dépendance en mesurant l'effet gluCEST à des valeurs de pH allant de 3,5 à 10 (**Figure V.14**).

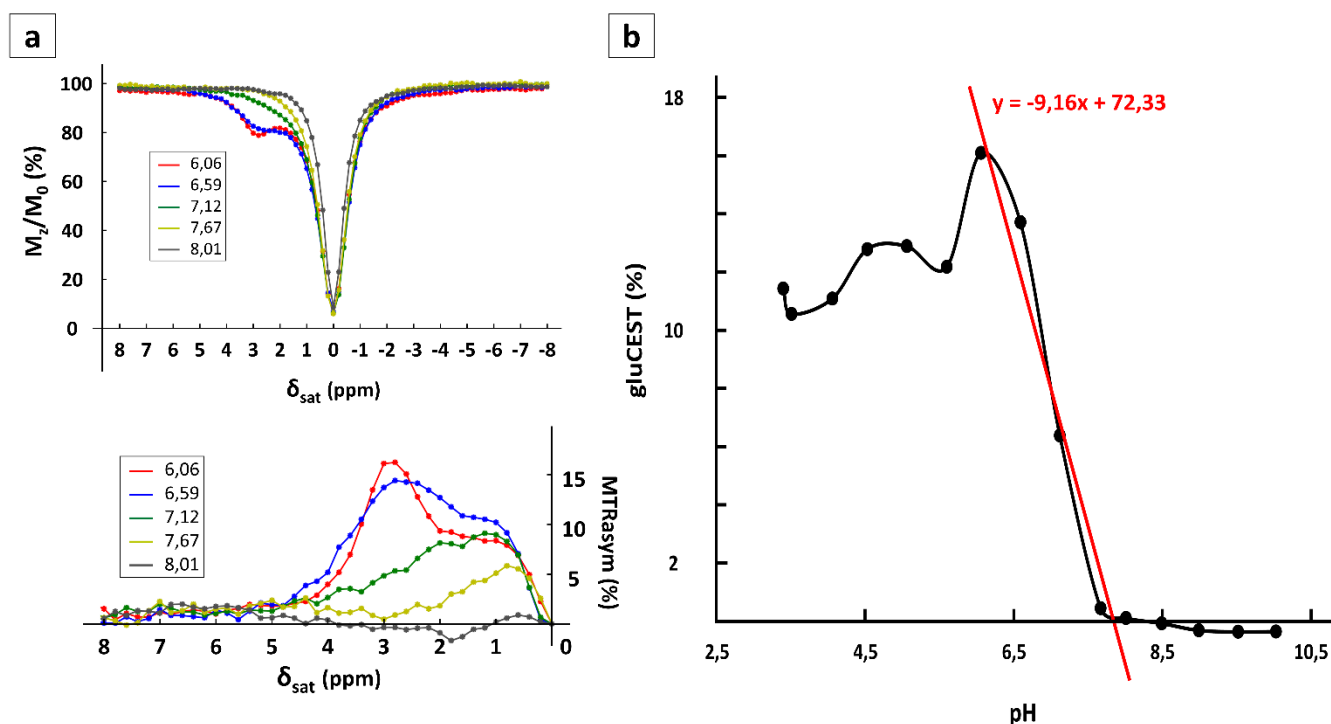


Figure V.14 : Influence du pH sur le contraste gluCEST.

- Z-spectra et MTRasym de solutions de glutamate de même concentration et de pH variables (de 6 à 8).
- Effet MTRasym à 3 ppm en fonction du pH.

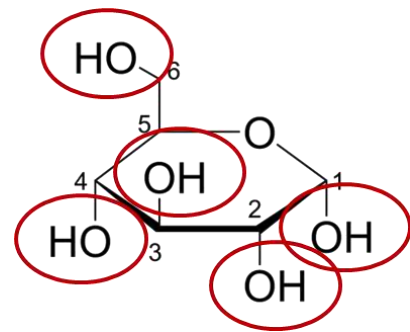
Si on observe la **figure V.14a**, on remarque un décalage du pic correspondant au maximum de l'effet CEST selon la valeur du pH jusqu'à totalement disparaître. Lorsque le pH augmente, le taux d'échange augmente jusqu'à ce que les conditions d'observation de l'effet CEST ne soient plus respectées c'est-à-dire jusqu'au moment où les deux populations de protons ne sont plus discernables (cf **figure III.6** du chapitre III). Si on mesure l'effet gluCEST à 3 ppm en fonction du pH (**figure V.14b**), on peut distinguer 3 stades. Tout d'abord, la quantité de signal gluCEST est relativement constante pour les petites valeurs de pH (< 6) puis on voit apparaître une phase de transition pendant laquelle le signal

semble avoir une dépendance linéaire au pH (pour des valeurs entre 6 et 7,5) et enfin, aucune détection du glutamate pour des pH supérieurs à 7,5. Ces trois étapes représentent les 3 régimes d'échanges (lent, intermédiaire et rapide) déterminant pour la caractérisation de l'effet CEST. Le pH étant caractéristique de l'altération des tissus biologiques, il est impératif de prendre en compte sa stabilité pour interpréter les variations du contraste gluCEST *in vivo*.

B. Détection du glucose par imagerie glucoCEST

Le glucose étant la source d'énergie des cellules, l'altération du métabolisme énergétique dans les MN aura potentiellement un impact sur la concentration ainsi que la consommation de glucose dans le cerveau. Le développement de l'imagerie glucoCEST, dont le signal est issu des protons hydroxyles (-OH) labiles de la molécule (**Figure V.16**), offre donc la possibilité de mesurer cette concentration de façon non-invasive et avec une bien meilleure résolution spatiale que la tomographie par émission de positon (TEP) traditionnellement utilisée pour cartographier la consommation de glucose.

Figure V.16 : Représentation de la molécule de glucose dont les protons -OH (entourés en rouge) sont labiles.



1. Détermination des paramètres de saturation

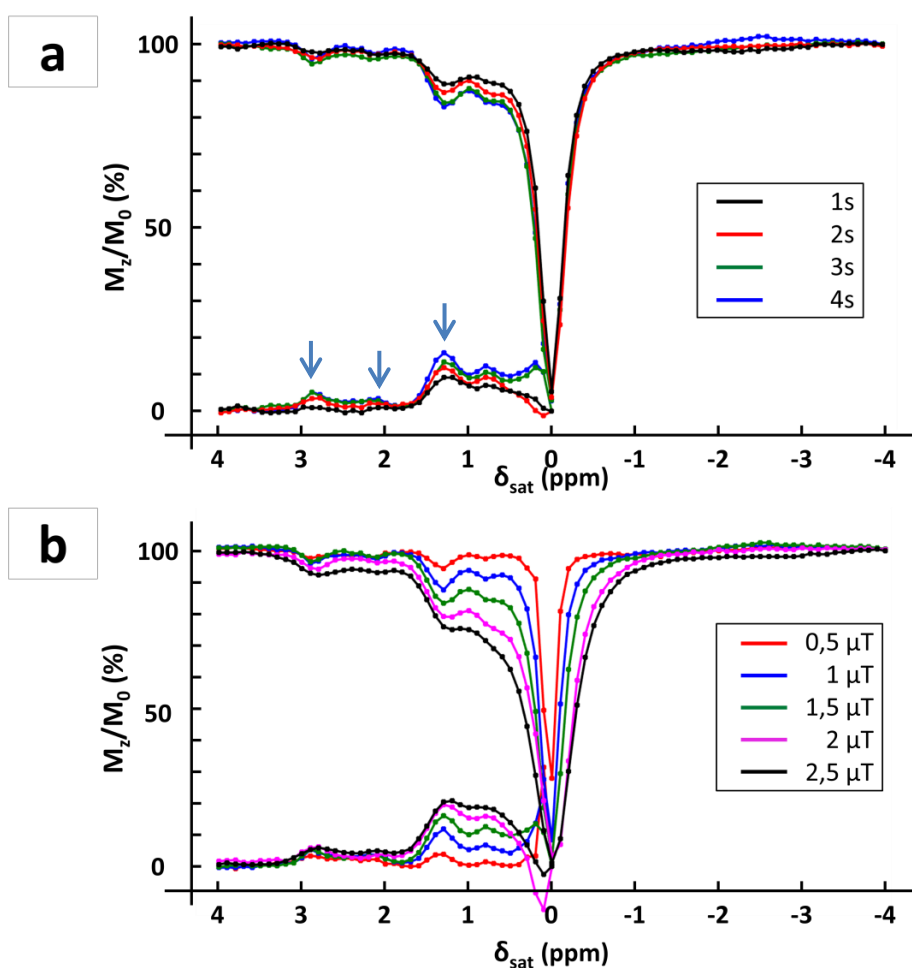
Afin de déterminer les paramètres de saturations optimaux ainsi que le seuil de détection du glucose par imagerie CEST, nous avons à nouveau réalisé une étude sur fantôme. Le fantôme est constitué de solutions de glucose concentrées de 0 à 30 mM qui ont été soumises à des temps de saturation allant de 1 à 4 s et des valeurs de B_1 de 0,5 à 2,5 μT (**Figure V.17**).

Comme on peut le voir sur la **figure V.17a**, la détection du signal glucoCEST s'améliore avec la durée du temps de saturation : spécialement pour un t_{sat} supérieur à 2 s où on peut voir apparaître les différents pics relatifs du glucose à 1,2 ppm, 2,1 ppm et 2,9 ppm (Walker-Samuel et al., 2013). Notre choix se portera finalement sur un temps de saturation de 4s qui semble être le t_{sat} pour lequel le contraste glucoCEST obtenu est le plus élevé notamment pour les pics situés après 2 ppm, moins intenses. A partir de ce choix, nous avons observé l'évolution du signal en faisant varier la puissance de saturation (B_1) pour ce temps de saturation (**Figure V.17b**). Le signal augmente donc avec le B_1 mais, comme pour le gluCEST, à partir d'une valeur de saturation trop élevée (ici 2 μT), le signal CEST est en partie recouvert par l'effet de la saturation directe des protons de l'eau libre. En conséquence, nous avons décidé de garder une valeur de B_1 égale à 1,5 μT .

Figure V.17 : Z-spectra et MTRasymy obtenus pour une solution de D-glucose concentrée à 30mM.

a. Z-spectra et MTRasymy en fonction du temps de saturation t_{sat} : 1s, 2s, 3s et 4s respectivement en noir, rouge, vert et bleu.

b. Z-spectra et MTRasymy en fonction du B_1 : 0,5 μ T en rouge, 1 μ T en bleu, 1,5 μ T en vert, 2 μ T en rose et 2,5 μ T en noir.



2. Détermination du seuil de détection du signal glucoCEST

Nous avons ensuite étudié la corrélation entre l'effet CEST et la concentration de glucose afin de déterminer le seuil de détection du glucose par imagerie CEST (**Figure V.18**). Il est donc possible de visualiser un signal glucoCEST pour des concentrations faibles (à partir de 3 mM) et par conséquent de cartographier les variations de glucose dans le cerveau dont la concentration moyenne est d'environ 4,5 mM (Criego et al., 2005).

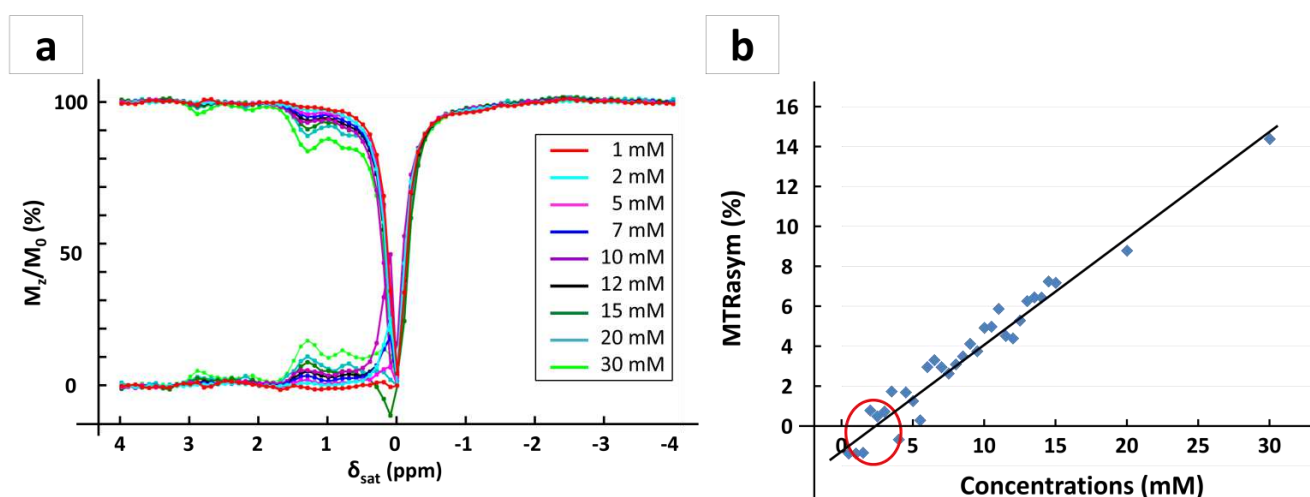


Figure V.18 : Dépendance de l'effet glucoCEST à la concentration de glucose.

- a. Z-spectra et MTRasym correspondants aux solutions de concentrations 1 mM, 2 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 12 mM, 15 mM, 20 mM et 30 mM.
- b. Mesure du signal glucoCEST à la fréquence du pic principal (1,2 ppm) en fonction de la concentration. La dépendance du signal à la concentration de glucose est mise en évidence sur cette figure ainsi que le seuil de détection du glucose par imagerie CEST autour de 3 mM (cercle rouge).

Les paramètres définis sur fantôme ($B_1 = 1,5 \mu\text{T}$ et $t_{sat} = 4 \text{ s}$) ont donc ensuite été appliqués à la détection du glucose *in vivo*. Cependant, la caractérisation du signal glucoCEST est complexe *in vivo* car un bon nombre de molécules (telles que le myo-inositol ou le glycogène) résonnent autour de la même fréquence et peuvent contribuer au signal CEST. Par conséquent, l'évaluation de la concentration de glucose « au repos » est compliquée. Il est néanmoins possible de détecter les variations du signal en cas d'injection de glucose dans le sang (Nasrallah et al., 2013) par rapport au contraste de base. Ces résultats sont présentés dans le chapitre IX.

C. Imagerie APT & NOE

Dans les maladies neurodégénératives, le pH est considéré comme un biomarqueur potentiel des défauts du métabolisme énergétique (Chaumeil et al., 2012). En utilisant l'imagerie APT, il est possible de cartographier les variations de pH dans le cerveau (Sun et al., 2012). La difficulté principale concernant l'imagerie APT réside dans la quantification de l'effet CEST. Effectivement, en utilisant les paramètres de saturation permettant la détection du contraste APT établis par la littérature ($B_1 = 1 \mu\text{T}$ et $t_{sat} = 1 \text{ s}$), on peut clairement voir apparaître l'effet APT à 3,5 ppm sur le Z-spectrum ainsi qu'un deuxième effet à la fréquence de -3,5 ppm : l'effet NOE (**Figure V.19**).

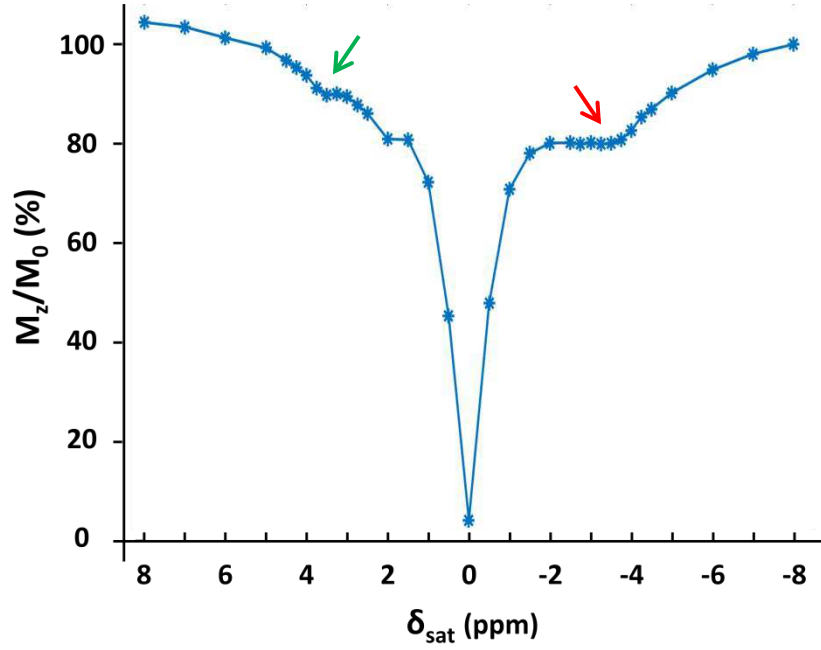


Figure V.19 : Z-spectrum acquis dans le cerveau d'un rat pour une saturation de 1 μ T appliquée pendant 1 s.

Les effets APT et NOE sont désignés par les flèches rouges à 3,5 ppm et -3,5 ppm respectivement.

Cet effet NOE provient de macromolécules et notamment de protéines dont la concentration ou le fonctionnement peuvent être altérés dans les MN. En conséquence, il est impossible de différencier la contribution de l'APT et du NOE par un calcul classique du MTRasym.

Des méthodes alternatives permettant de s'affranchir du calcul asymétrique ont été proposées, notamment celle consistant à calculer les effet APT et NOE apparents (Jin et al., 2013) définis respectivement par les acronymes APT* et NOE*. Le calcul est effectué en générant une fonction affine reliant les bornes de l'effet (de 3 à 4 ppm pour l'APT et de -2 à -5 ppm pour l'effet NOE) à laquelle est soustrait le Z-spectrum (**Figure V.20**).

Mathématiquement, cette méthode est décrite par la formule :

$$MTR^* = \left\{ \frac{M_{ZA}(\delta - \Delta) + M_{ZA}(\delta + \Delta)}{2} - M_{ZA}(\delta) \right\} / M_{0A} \quad (\text{V.1})$$

avec

δ , la fréquence de saturation des protons d'intérêt,

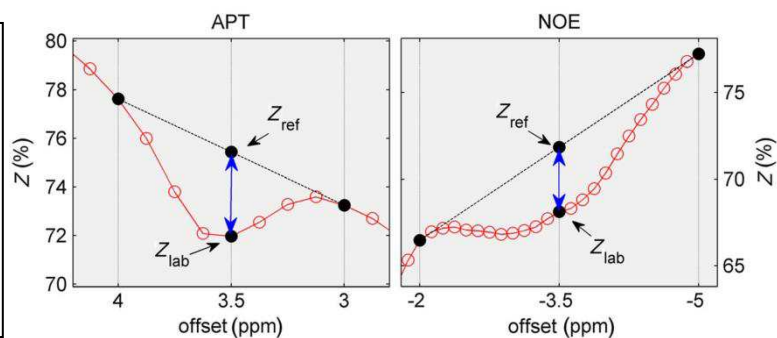
$(\delta - \Delta)$ et $(\delta + \Delta)$, les fréquences aux bornes de l'effet CEST mesuré et

M_{ZA} , l'aimantation longitudinale de l'eau libre.

Figure V.20 : Méthode de mesure de l'effet CEST par la méthode des 3 offsets. (Xu et al., 2014)

$$Z_{ref} = \left\{ \frac{M_{ZA}(\delta - \Delta) + M_{ZA}(\delta + \Delta)}{2} \right\} / M_{0A}$$

$$Z_{lab} = M_{ZA}(\delta) / M_{0A}$$



Cette approche a été utilisée dans notre protocole d'imagerie de la colonie de rats modèles de la maladie de Huntington (voir chapitre VIII).

Tableau récapitulatif des paramètres de saturation utilisés

Modalité CEST	Protons détectés	Temps de saturation (t_{sat})	Intensité du champ de saturation (B_1)	Fréquence de saturation (δ_{sat})
GluCEST	-NH ₂	1 s	5 μ T	3 ppm
GlucCEST	-OH	4 s	1,5 μ T	1 ppm
APT	-NH	1 s	1 μ T	3,5 ppm

Chapitre VI : Modèles animaux pour l'étude de la maladie de Huntington

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre introductif de ce manuscrit, si l'origine génétique de la MH est parfaitement établie, l'évolution de la maladie, son développement au niveau cellulaire et son impact sur le métabolisme énergétique menant à la dégénérescence neuronale ne sont pas encore totalement connus. Par conséquent, il est primordial de pouvoir étudier de façon précise les diverses étapes de l'évolution de la maladie pour en comprendre sa physiopathologie globale. Pour cela, le recours aux modèles animaux est une solution très pertinente. En effet, la diversité des modèles permet de cibler précisément une réaction, un processus ou une cible potentielle de la maladie. De plus, les modèles animaux permettent également de mettre au point des approches thérapeutiques innovantes et d'en évaluer leur efficacité. Enfin, leur utilisation permet d'identifier des biomarqueurs clés de la maladie. La pertinence de ces biomarqueurs peut ensuite être évaluée dans un contexte clinique. Dans ce chapitre, nous traiterons de l'importance et de la difficulté de caractériser ces modèles animaux afin d'identifier des biomarqueurs pertinents de la MH. Enfin, nous présenterons les trois modèles animaux utilisés durant cette thèse pour évaluer la pertinence de nos développements méthodologiques sur l'imagerie CEST.

I. Une grande diversité de modèle animaux

Les modèles animaux sont fréquemment utilisés pour l'étude des maladies neurodégénératives. Une des caractéristiques de ces maladies étant l'altération des cellules neuronales, il existe par conséquent plusieurs façons de reproduire le phénotype de la pathologie chez l'animal. Dans le cas de la MH, les premiers modèles sont apparus bien avant la découverte de la mutation génétique (Haigh et al., 1993) et ont donc été développés à partir des lésions neuronales observées chez les patients. La neurodégénérescence peut ainsi être mimée par l'injection de produits neurotoxiques tels que l'acide kaïnique ou l'acide quinolique qui induisent des réactions excitotoxiques (Beal et al., 1986; Mcgeer and Mcgeer, 1976) ou encore en injectant des toxines agissant sur les mitochondries comme l'acide 3-nitropropionique (3NP) qui inhibe le complexe II (succinate dehydrogenase) ainsi que le transport d'électron de la chaîne respiratoire, ayant pour conséquence de bloquer la production d'ATP (Brouillet et al., 1993). Bien que très intéressants pour identifier les défauts de production énergétique, ces modèles d'intoxication engendrant des lésions excitotoxiques ne reflètent pas l'origine génétique de la MH. De plus, ces lésions sont la plupart du temps localisées dans le striatum, ce qui ne permet pas de comprendre les interactions à longue échelle dans tout le

cerveau. En effet, la huntingtine étant une protéine ubiquitaire, il est très probable que d'autres structures du cerveau soient affectées, même si une dégénérescence des neurones striataux est principalement observée.

A partir de l'identification du gène responsable de la MH, des modèles génétiques exprimant la protéine huntingtine (HTT) mutée ont été générés afin d'obtenir un phénotype plus proche de celui de l'homme (Pouladi et al., 2013). Bien qu'il existe des modèles transgéniques impliquant d'autres animaux comme le ver (Holbert et al., 2003; Parker et al., 2001) ou la drosophile (Feany and Bender, 2000), les plus utilisés restent les modèles rongeurs. En effet, de par leur facilité d'hébergement et de manipulation, les rongeurs sont les animaux les plus utilisés en recherche pré-clinique. Les modèles rongeurs les plus pertinents pour la MH sont des modèles dont le matériel génétique a été modifié afin de se rapprocher le plus fidèlement possible de la forme humaine de la maladie. Ainsi, il est possible d'intégrer une partie ou l'intégralité du gène *htt* muté humain dans le génome des rongeurs ou de modifier directement les gènes endogènes en augmentant le nombre de répétitions du triplet CAG. Dans cette partie, nous présenterons les stratégies les plus utilisées ainsi que les modèles rongeurs étudiés dans le cadre de cette thèse.

A. Modèles rongeurs transgéniques

Le gène *HTT* étant de grande taille (180 000 paires de bases soit 180 kilobases – (Ambrose et al., 1994)), les premiers modèles de souris transgéniques générés contiennent seulement une petite portion du gène appelée partie 5' correspondant au début du gène composé de l'exon 1 avec un nombre important de répétitions CAG. Ces souris présentent généralement un phénotype très prononcé : elles développent des problèmes moteurs forts de façon très précoce et leur espérance de vie est relativement courte (Menalled et al., 2009). Par exemple, la lignée R6/2 est la plus utilisée à ce jour (Li et al., 2005) car elle présente le phénotype le plus marqué. Le large nombre de répétitions CAG (144) entraîne en effet des symptômes moteurs et cognitifs dès 5-6 semaines et les souris ne survivent généralement pas plus de 13 semaines. Ce modèle est très souvent considéré comme une forme juvénile de la MH (Lione et al., 1999).

D'autres modèles, tels que les souris N171-82Q, possèdent des mutations différentes de la partie 5' (171 acides aminés et 82 glutamines – (Schilling et al., 1999)). Dans ce modèle, la déclaration des symptômes de la maladie est plus tardive : les désordres moteurs et cognitifs apparaissent vers le 3^e mois, la durée de vie des souris se retrouve néanmoins réduite à 5-6 mois (McBride et al., 2006; Ramaswamy et al., 2007). Il existe également un modèle transgénique de rat possédant 51 répétitions CAG dénommé tgHD. Le nombre réduit de répétitions aboutit à une progression plus lente de la pathologie, plus représentative de la MH. Ainsi, les rats transgéniques ne montrent des problèmes moteurs qu'au bout de 10 à 15 semaines accompagnés d'une réduction progressive de poids. Aucune modification de la longévité n'a cependant été constatée.

Grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la génétique, peu de temps après, des modèles rongeurs possédant l'intégralité du gène *HTT* humain ont pu être générés. Ces animaux sont modifiés génétiquement afin de leur faire exprimer la *Htt* humaine mutée et la *Htt* murine endogène en utilisant des YAC (pour Yeast Artificial Chromosome) ou des BAC (pour Bacterial Artificial Chromosome). Les plus utilisés jusqu'à présent sont les souris YAC128 (Slow et al., 2003) et les souris BACHD (Gray et al., 2008) possédant respectivement 128 et 97 répétitions CAG espacées par des CAA de manière à

empêcher une expansion des répétitions comme il est possible d'observer chez les R6/2 (Menalled and Brunner, 2014). Les modèles possédant l'intégralité de la Htt ont un phénotype plus tardif et une durée de vie normale comparés aux modèles présentés précédemment. Chez les souris YAC128, les troubles moteurs sont visibles à partir de 6 mois et s'accompagnent d'une accumulation progressive de Htt mutée au sein des neurones du striatum détectable à 12 mois (Slow et al., 2003). La neurodégénérescence du striatum est visible à partir de 9 mois. Chez les souris BACHD, des problèmes de coordination motrice ont été décelés dès 2 mois et des agrégats de Htt mutée apparaissent dans le cortex et légèrement dans le striatum. A l'inverse des patients MH, ces deux modèles présentent une augmentation de poids qui peut avoir une influence sur le niveau d'activité et biaiser l'interprétation des tests moteurs. Il existe également un modèle rat BACHD qui sera décrit plus précisément dans la partie II.

Récemment, une nouvelle lignée de souris MH a été créée en croisant des souris BACHD et des souris YAC18 qui possèdent le gène HTT humain sauvage avec 18 répétitions CAG. Ce modèle, appelé Hu97/18, contient les deux allèles du gène htt humain avec respectivement 97 et 18 répétitions CAG et n'exprimera donc pas le gène murin (Southwell et al., 2013). Dernièrement, la même équipe a développé la lignée Hu128/21 selon les mêmes procédés en utilisant des souris YAC128 à la place des BACHD (Southwell et al., 2017). Ces 2 modèles sont prometteurs car, n'exprimant que le gène HTT humain, le développement de la pathologie pourrait se révéler fidèle au phénotype de la MH et présenter un intérêt notamment pour l'exploration de stratégies thérapeutiques comme la thérapie génique.

B. Modèles Knock-In

Les modèles Knock-In (KI) sont générés en suivant une approche différente des modèles précédemment exposés. En biologie moléculaire, la technique de knock-in consiste à introduire un gène d'intérêt dans un locus du gène cible. Ce gène est alors placé sous le contrôle du promoteur du gène cible et le gène d'intérêt est donc exprimé à la place du gène cible. Le gène ainsi exprimé est la plupart du temps un gène chimérique rongeur/humain. Ces animaux présentent donc l'avantage de pouvoir étudier le gène HTT muté dans un contexte endogène car l'intégration du transgène humain, dans les autres modèles, peut altérer son expression. Les lignées les plus utilisées sont les souris HdhQ111 (Wheeler et al., 1999), KI140 (Menalled et al., 2003), HdhQ150 (Lin et al., 2001) et les zQ175 (Menalled et al., 2012) et possèdent respectivement 111, 140, 150 et 190 répétitions du triplet CAG. Le phénotype de ces modèles est très léger, c'est pourquoi la plupart des études utilisent les animaux homozygotes qui expriment le gène muté dans les deux allèles. Ces modèles permettent de reproduire une forme plus progressive de la maladie avec probablement une phase d'atteinte précoce mais qui n'est pas encore délétère pour les neurones, puis une phase d'installation progressive de la neurodégénérescence.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié trois modèles rongeurs de la MH de type différent : les souris R6/1, les rats BACHD et les souris KI140. Dans la suite du chapitre, nous présenterons les caractéristiques principales de ces modèles et les suivis non IRM effectués.

Modèles souris						
Modèles transgéniques	Model	Transgène	Longévité	Sévérité	Désordres neuropathologiques	Références
	R6/1	HTT Humaine, exon 1 : 116 répétitions du triplet CAG	8 mois	Déficit moteurs à 5 mois	Agrégats de HTT à 5 mois	Mangiarini et al. (1996)
	R6/2	HTT Humaine, exon 1 : 144 répétitions du triplet CAG	13 semaines	Déclaration juvénile de la maladie. Déficits moteurs à 5-6 semaines	Agrégats de HTT à 4 semaines	
	N171-82Q	HTT humaine, partie N-terminal : 82 répétitions du triplet CAG	4-6 mois	Déficits moteurs	Perte de neurones à 20 semaines et agrégats de HTT augmentant avec l'âge	Schilling et al. (1999) - Yu et al., (2003)
	BACHD	HTT humaine totale : 97 répétitions du triplet CAG	Normal	Déclaration de la maladie au stade adulte. Déficit moteurs à 24 semaines	Atrophie du striatum (≈28%) et du cortex (≈32%) à 48 semaines	Gray et al., (2008)
	YAC128	HTT humaine totale : 128 répétitions du triplet CAG	Normal	Déclaration de la maladie au stade adulte. Déficit moteurs à 24 semaines	Atrophie du striatum (≈12%) et du cortex (≈8%) à 48 semaines	Hodgson et al., (1999) – Slow et al., (2008)
	GFAP-HD	HTT humaine, partie N-terminal : 160 répétitions du triplet CAG	Moins que les WT	Déficits moteurs		Bradford et al., (2009)
	Hu97/18 Hu128/21	No mouse HTT Double human HTT allele				Southwell et al., (2008)
Modèles Knock-In		HTT souris avec une expansion de répétitions du triplet CAG : 111, 140, 150 et 190	Normal	Déclaration tardive de la maladie Déficits moteurs variables	Agrégats de HTT dans les neurones du striatum.	Menalled et al., (2003) – Lin et al., (2001) – Woodman et al., (2007) – Heng et al., (2007)

Tableau VI.1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des principaux modèles transgéniques utilisés pour l'étude de la maladie de Huntington.

Ce tableau résume les caractéristiques principales des modèles transgéniques de la MH à savoir le transgène inséré, la longévité des souris, la sévérité du modèle (déclaration des symptômes tels que les troubles moteurs) et les altérations cellulaires rencontrées dans ces modèles.

II. Le modèle souris KI140

A. Présentation générale

Le modèle souris KI140 est un modèle knock-in présentant un gène chimérique souris/humain contenant 140 répétitions au sein de l'exon 1 inséré dans le gène endogène souris HTT codant pour la protéine Htt (Menalled et al., 2003). Les souris KI140 peuvent présenter deux génotypes différents en fonction du nombre d'allèles mutés : des souris hétérozygotes comportant sur le chromosome 4 un allèle sauvage et un allèle codant pour la Htt mutée ou des souris homozygotes comportant deux allèles mutés codant pour la protéine Htt mutée. La sévérité de la maladie étant associée à l'accumulation de protéines mutées, il est raisonnable de penser que les souris homozygotes présenteront un phénotype plus sévère que les souris hétérozygotes. Ce postulat a notamment été vérifié grâce aux études comportementales menées sur notre colonie, mais également par des mesures du volume striatal, du profil métabolique ou de niveau de glutamate mesuré par imagerie gluCEST. Ces résultats sont extensivement développés dans le chapitre **VII** de ce manuscrit. Afin d'évaluer l'effet du gène muté, les souris KI140 hétérozygotes et homozygotes ont été comparées à des souris de même fond génétique. Pour cela, le groupe contrôle appelé groupe sauvage (*Wild-type* - WT) correspond aux souris littermates possédant deux allèles sauvages.

B. Atteintes comportementales

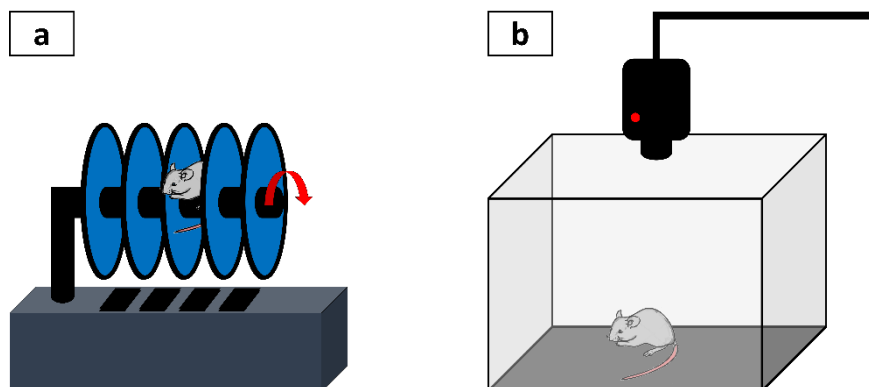


Figure VI.1 : Représentation schématique des tests comportementaux de rotarod (a) et d'open-field (b) effectués sur des rongeurs.

La MH étant caractérisées par différentes atteintes au niveau psychiatrique, cognitif ou moteur, la possibilité de tester ces différents aspects est primordiale pour bien caractériser le modèle, en évaluer sa pertinence ainsi que pour établir le décours temporel de l'apparition de ces atteintes. Grâce au concours de la plateforme d'analyse comportementale de MIRCen et grâce à l'aide précieuse d'anciens et actuels membres de l'unité de recherche (Laetitia Francelle, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage et Lucie de Longprez en particulier), les KI140 ont été soumises à différents tests : le rotarod

(**Figure VI.1a**) pour la coordination motrice et l'open-field (**Figure VI.1b**) pour estimer le niveau d'anxiété, augmentant en cas de troubles psychiatriques.

1. Test du rotarod

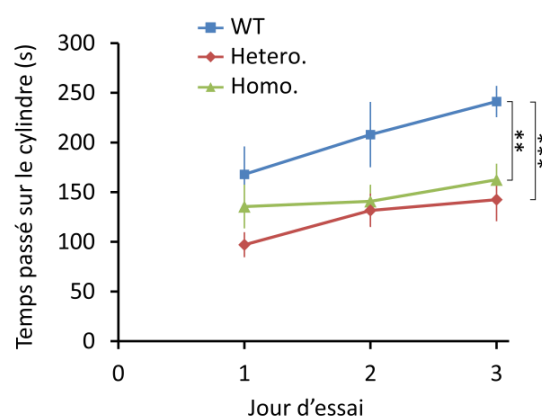
Ce test permet d'évaluer la coordination et la force des souris. Pour effectuer un test rotarod, les animaux sont placés sur un cylindre rotatif tournant dans un premier temps à une vitesse peu élevée afin que les animaux se familiarisent avec le mécanisme. La seconde étape de ce test consiste à augmenter la vitesse de rotation du cylindre jusqu'à ce que les animaux ne puissent plus se maintenir dessus.

6 souris sauvages, 9 hétérozygotes et 10 homozygotes, âgées entre 10 et 13 mois, ont été testées avec un cylindre tournant pendant 5 minutes à une vitesse allant de 4 à 40 rotations par minutes (rpm). En moyennant le temps pendant lequel les souris parviennent rester sur le cylindre au bout de 3 essais, nous pouvons remarquer que les souris Huntington (hétérozygotes et homozygotes) présentent des performances motrices plus faibles que les souris sauvages. En effet, elles tombent plus rapidement du cylindre que les souris sauvages. Ce test n'a en revanche permis d'établir de différences entre les souris hétérozygotes et homozygotes : les performances moyennes des deux groupes sont effectivement similaires et ont une évolution comparable sur les trois jours de tests (courbes rouge et verte de la **figure VI.2**, respectivement). De plus, les souris sauvages semblent tenir de plus en plus longtemps sur le cylindre au fur et à mesure des essais, du fait de l'entraînement, alors que les souris Huntington tombent toujours du cylindre autour du même moment, c'est-à-dire 150 s. Cette observation suggère également une limite des capacités physiques des souris hétérozygotes et homozygotes.

Figure VI.3 : Test rotarod évaluant la coordination motrice et la force des souris KI140.

Les souris sauvages (en bleu) tiennent plus longtemps sur le cylindre que les souris hétérozygotes (en rouge) et les souris homozygotes (en vert).

La significativité statistique de cette différence a été établie en effectuant un test ANOVA unidirectionnel les données mesurées pour les trois jours d'acquisition et est atteinte à partir d'une valeur de p-value inférieure à 0,05 (** si $p < 0,01$ et * si $p < 0,05$).



2. Test de l'open-field

Le test de l'open-field consiste à analyser le comportement exploratoire du rongeur dont les changements peuvent potentiellement être corrélés à des déficits moteurs ou un stress de l'animal : une souris anxieuse parcourra par exemple moins de distance et évitera le centre de l'arène ouverte pour rester proche des parois. L'anxiété peut être rapportée à l'équivalent des désordres psychiatriques, figurant parmi les symptômes de la MH, chez la souris.

Nous avons donc mesuré la distance totale parcourue par les souris (3 souris sauvages, 5 hétérozygotes et 8 homozygotes âgées de 9 à 12 mois) dans un terrain de 50x50 cm² pendant 10 minutes, ainsi que le temps passé sur les membres postérieurs et à se toiletter. Ces paramètres sont connus pour respectivement diminuer et augmenter en cas d'anxiété. Les résultats présentés en **Figure VI.3** montrent une altération des performances chez les souris Huntington (hétérozygotes et homozygotes). On constate d'ailleurs une différence statistiquement significative de comportement entre les souris sauvages et les homozygotes. En effet, comparées aux sauvages, les souris homozygotes passent peu de temps sur les membres postérieurs (environ 50 % de moins, **Figure VI.3a**) et au contraire se toilettent régulièrement (deux fois plus en moyenne, **Figure VI.3b**). De plus, on remarque que les souris homozygotes parcourent moins de distance (**Figure VI.3c**). Ceci peut s'expliquer à la fois par l'anxiété et les désordres moteurs développés par ces souris. De façon intéressante, en suivant l'évolution de chaque paramètre pour chaque groupe, on observe une tendance des hétérozygotes à avoir un comportement exploratoire intermédiaire aux deux autres groupes (**Figure VI.3**) qui pourrait être corrélé à un développement plus sévère de la pathologie chez les homozygotes.

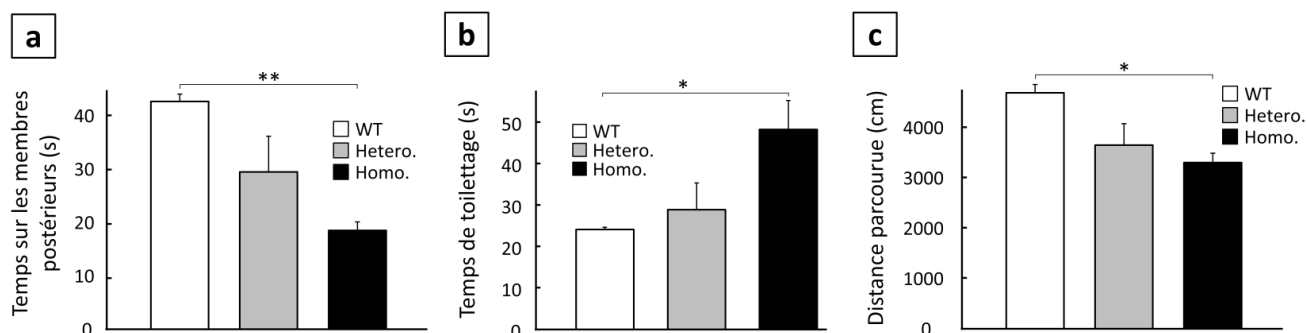


Figure VI.3 : Test Open-field évaluant les capacités exploratoires des souris KI140.

Le temps passé sur les pattes postérieures (a), le temps passé à se toiletter (b) et la distance totale parcourue (c) ont été mesurés. Pour chaque histogramme, les résultats correspondant aux souris sauvages, hétérozygotes et homozygotes sont respectivement en blanc, gris et noir.

Ainsi les tests comportementaux réalisés sur la colonie de souris KI140 de MIRCen ont permis de mettre en évidence une altération des performances pour les souris Huntington. L'analyse de ces résultats suggère même que les souris homozygotes sont plus affectées que les hétérozygotes. Ces

résultats restent toutefois préliminaires et nécessitent une caractérisation plus précise du comportement de ces souris notamment par l'utilisation d'un nombre plus élevé d'animaux ou en effectuant d'autres tests (labyrinthe en Y ou en X, ...).

C. Marquage histologique

La caractérisation du modèle passe également par l'étude des altérations du tissu cérébral en effectuant des mesures par immunohistochimie qui est une technique qui consiste à utiliser des anticorps afin de localiser spécifiquement des protéines ou des cellules dans les tissus biologiques : on parle aussi de marquage. Les cerveaux des souris ont donc été récupérés, post-fixés puis coupés en plusieurs coupes histologiques pour ensuite être spécifiquement marqués pour révéler les agrégats de Htt mutée ou attester de la densité neuronale. L'utilisation d'anticorps EM48 a permis de déceler des agrégats de protéine mutée dans le striatum et le cortex des souris Huntington (ligne supérieure de la **figure VI.4**). Il semble par ailleurs que le nombre d'inclusions soit plus important chez les souris homozygotes que chez les hétérozygotes ce qui appuie l'hypothèse que les homozygotes semblent plus affectées d'un point de vue moléculaire que les hétérozygotes. L'analyse de la densité de cellules neuronales a été réalisée en effectuant un marquage NeuN (ligne inférieure de la **figure VI.4**) ciblant spécifiquement les neurones. Cet outil nous a permis de mesurer une densité plus faible de neurones chez les souris hétérozygotes comparées aux souris sauvages et encore plus réduite pour les souris homozygotes : la mort neuronale semble donc plus importante chez ces dernières. Ces résultats semblent confirmer les observations faites à partir des tests comportementaux et les précédentes études du modèles (Menalled et al., 2003 – Menalled et al., 2012 – (Francelle et al., 2015)) stipulant que les symptômes sont plus prononcés chez les souris homozygotes que chez les souris hétérozygotes.

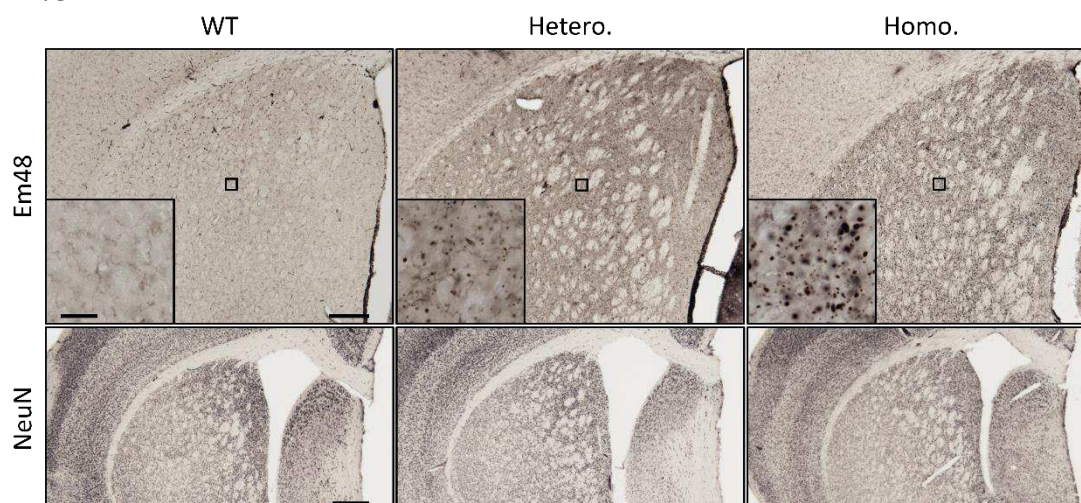


Figure VI.4 : Résultats des marquages immunohistochimiques réalisés sur les souris KI140.

Le marquage d'immunohistochimie a été réalisé dans le striatum et le cortex des souris sauvages(gauche), hétérozygotes (milieu) et homozygotes (droite). Le marquage des agrégats de mHtt effectué à l'aide d'anticorps EM48 est montré sur la partie supérieure de la figure. Le marquage de la densité neuronale effectué avec l'emploi d'anticorps NeuN est montré sur la partie inférieure de la figure.

En conclusion, le modèle montre des caractéristiques cohérentes avec les symptômes observés chez les patients atteints de la MH (déficits moteurs, agrégation de mHtt et perte de neurones dans le striatum et le cortex). De plus, les souris homozygotes semblent présenter un développement plus sévère de la pathologie ce qui est intéressant pour l'étude des différents stades de la maladie. Ce modèle semble donc être particulièrement pertinent pour une étude visant à identifier des biomarqueurs intéressants de la maladie. Cela fera l'objet du chapitre suivant.

III. Le modèle souris R6/1

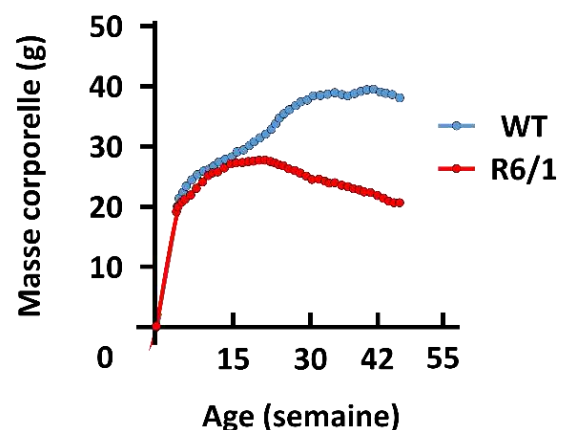
Le modèle R6/1 est un modèle souris exprimant une partie de la mHtt humaine avec 115 répétitions CAG contenus dans l'exon 1.

En s'appuyant sur la littérature, de nombreuses différences ont été observées chez les souris R6/1 comparées aux souris sauvages de même fond génétique. On note par exemple un poids plus faible chez les R6/1 comparées aux souris sauvages (Clifford et al., 2002; Naver et al., 2003) (**Figure VI.5**).

Figure VI.5 : Evolution de la masse corporelle de souris R6/1 comparées à des souris contrôles.

Deux groupes de souris, sauvages et R6/1, composés de 12 et 26 animaux respectivement, ont été pesés de façon hebdomadaire pendant 50 semaines.

On remarque que la masse corporelle des souris R6/1 (courbe rouge) est plus faible que celle des souris sauvages (courbe bleue) à partir de 15 semaines. (Figure générée à partir des données de l'étude de Clifford et al., 2002).



A. Altération du comportement chez les souris R6/1

De nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation du modèle R6/1 que ce soit aux stades précoces (Bolivar et al., 2004) ou plus avancés (Naver et al., 2003) de la pathologie. L'évaluation des atteintes psychiatriques, cognitives ou motrices de ce modèle, a pu être effectuée au moyen de divers tests comportementaux. L'anxiété, par exemple, peut être une conséquence de troubles cognitifs voire psychiatriques chez les patients souffrant de la MH et est régulièrement explorée chez les modèles murins. Ainsi, dans de précédentes études, les souris R6/1 ont été soumises au test de l'open-field mais également en utilisant le labyrinthe en croix surélevé (plus-maze en anglais) qui sont des tests comportementaux standards pour déterminer le niveau d'anxiété d'un animal.

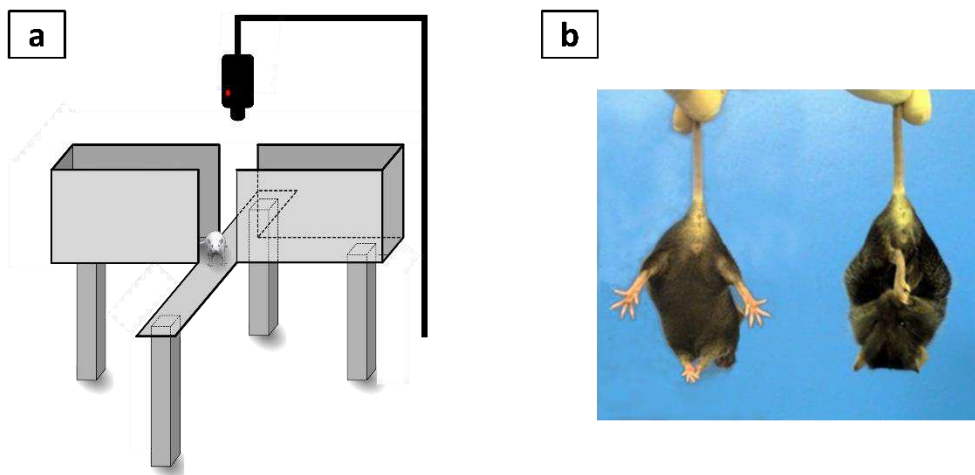


Figure VI.6 : Exemples de tests comportementaux : labyrinthe en croix surélevé (a) et claspings (b).

Image de test claspings tirée d'une étude faite sur des souris R6/2 (Garriga-canut et al., 2012).

Le labyrinthe en croix surélevé (**Figure VI.6a**) se résume à placer la souris au centre d'un labyrinthe à quatre chemins (deux avec des parois et deux sans paroi) pour ensuite évaluer le temps passé sur les différents chemins (une souris anxieuse passera très peu de temps dans les chemins ouverts). Il est également possible d'évaluer la « dépression » de la souris en effectuant un test de claspings (**Figure VI.6b**). Ce test consiste à suspendre la souris par la queue et de mesurer le temps qu'elle met à abandonner toute tentative d'évasion : dans ce cas, la souris se met dans une position renfermée comme la souris droite de la **figure VI.6b**.

Ainsi, les tests d'exploration (open-field et plus-maze) ont montré une diminution du temps passé sur les membres postérieurs et à renifler tout comme une augmentation du temps de toilettage chez les R6/1 : ces différences semblent s'amplifier avec l'âge (Clifford et al., 2002). Il arrive cependant de n'obtenir aucune différence significative par rapport aux souris sauvages (Naver et al., 2003). Les tests de claspings quant à eux ont montré que les souris R6/1 tendent à être plus déprimées que les souris sauvages (Clifford et al., 2002 - Naver et al., 2003).

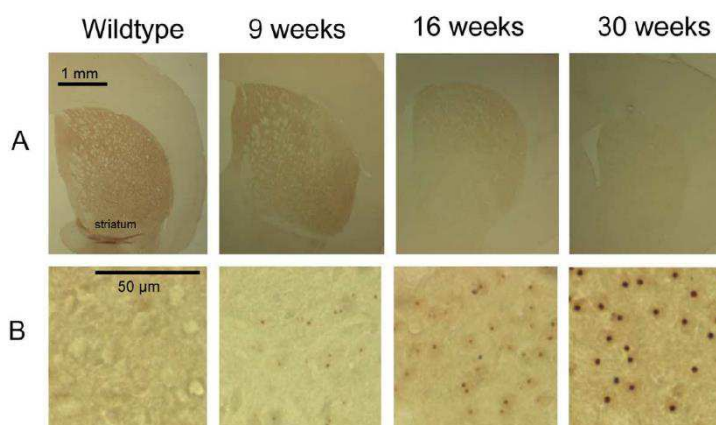
Les capacités motrices ont également été étudiées en mesurant la distance parcourue en open-field ainsi qu'en évaluant la démarche des souris (trajectoire et longueur des foulées) par observation des empreintes (footprinting). Les résultats obtenus indiquent une distance parcourue plus faible chez les souris R6/1 (Naver et al., 2003) ainsi qu'une réduction de la longueur des foulées (Clifford et al., 2002) qui sont les conséquences directes des déficits moteurs contractés par la pathologie. L'apparition des premiers symptômes est estimée à l'âge de 15-21 semaines (Mangiarini et al., 1996).

B. Altérations cellulaires

L'analyse du marquage immunohistochimique a montré l'apparition d'inclusions neuronales dès 9 semaines dans le striatum et le cortex (Naver et al., 2003). Le modèle ne semble cependant pas présenter de mort neuronale (Levine et al., 2004) mais présente une altération de la neurotransmission détectée grâce au marquage DARPP-32 qui cible la dopamine, neurotransmetteur notamment impliqué dans les fonctions de régulation des mouvements (Naver et al., 2003). Ce modèle est moins sévère que le modèle R6/2 en terme de densité d'agrégats, de troubles moteurs et de durée de vie (les R6/1 vivent jusqu'à 8-9 mois), ce qui permet d'effectuer un suivi longitudinal des animaux grâce notamment aux techniques d'imagerie et de spectroscopie dont nous présenterons les résultats dans le chapitre **VII** du manuscrit.

Figure VI.7 : Marquage immunohistochimique chez les souris R6/1 (Naver et al., 2003).

- A. Marquage DARPP-32. Altération de la neurotransmission augmentant avec l'âge des R6/1.
- B. Marquage ubiquitine. L'apparition d'inclusions intra-neuronales augmente avec l'âge des souris.



IV. Le modèle rat BACHD

Le modèle rat BACHD, comme le modèle souris, est un modèle transgénique dans lequel l'intégralité du gène HTT humain muté possédant 97 répétitions CAG/CAA au niveau de l'exon 1 a été introduite (Yu-Taeger et al., 2012). L'utilisation d'un modèle rat est intéressante dans la mesure où le système nerveux central est plus complexe et par conséquent plus proche de l'humain que les modèles souris. Le rat possède notamment de meilleures capacités d'apprentissage ce qui peut être un atout pour évaluer des déficits cognitifs plus subtiles comme aux stades précoces de la MH.

A. Mise en évidence des troubles moteurs du modèle

La publication de Yu-Taeger et al. (2012), dont l'équipe fut la première à générer ce modèle, a effectué toute une série d'analyses afin de caractériser ce modèle (Yu-Taeger et al., 2012).

Ainsi, les troubles moteurs développés par ce modèle ont été évalués au moyen du test rotarod. Les rats BACHD ont montré plus de difficultés à se maintenir sur le cylindre que ce soit à vitesse constante (12 rpm) ou pendant une accélération (4 à 40 rpm) (Abada et al., 2013). Ces performances s'aggravent avec l'âge également pour les rats sauvages ce qui peut s'expliquer par la prise de poids des rats qui rend la conservation de l'équilibre plus complexe.

Concernant la motricité d'exploration, les rats BACHD semblent avoir une hyperactivité aux stades très précoces (1 mois) comparés aux animaux sauvages qui va diminuer progressivement avec l'avancement de l'âge jusqu'à être significativement plus faible à partir de 4 mois.

La démarche des rats BACHD a ensuite pu être évaluée en utilisant le système catwalk qui mesure la vitesse de marche, la longueur des foulées et aussi la régularité des pas de l'animal. Mise à part une baisse de la longueur de foulée à 12 mois, les rats Huntington ne présentent aucune différence significative avec les contrôles (Abada et al., 2013).

B. Désordres cognitifs et altérations cellulaires chez les rats BACHD

Pour tester la cognition, les rats peuvent être soumis à un test de reconnaissance d'objet (Abada et al., 2013) : le rat est placé dans un endroit avec deux objets familiers identiques, puis on remplace l'un des objets par un objet inconnu et on mesure le temps d'exploration de chaque objet. Un animal avec des fonctions cognitives non-altérées ne passera que très peu de temps à explorer l'objet familier. Ainsi, on constate que les rats BACHD âgés de 4 mois ont un temps d'exploration plus élevé que les contrôles pour les deux objets (**Figure VI.8g**). De plus, lorsque l'expérience est de nouveau réalisée 8 mois plus tard, en utilisant les mêmes objets e1 et e2, on remarque que les rats contrôles ont un temps d'exploration équivalent et assez court pour les deux objets alors que les rats BACHD suivent le même schéma d'exploration que lors de la première expérimentation (**Figure VI.8g**). Ainsi, ce test permet de mettre en évidence les difficultés à reconnaître un objet chez les rats BACHD, ce qui reflète potentiellement des problèmes liés à une dégradation des fonctions cognitives.

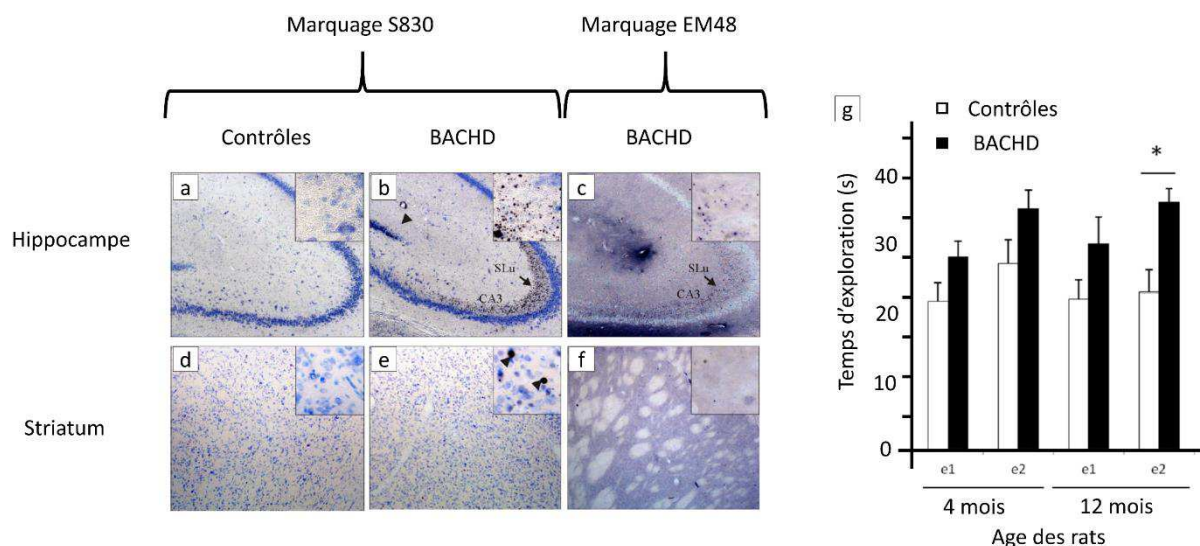


Figure VI.8 : Marquage immunohistochimique et test de reconnaissance d'objet chez les rats BACHD (Naver et al., 2003).

Plusieurs marquages histologiques ont été effectués dans l'hippocampe (a, b et c) et dans le striatum (d, e et f). Les deux colonnes de gauche montrent l'utilisation d'anticorps S830 et la colonne de droite l'anticorps EM48. Ces deux anticorps permettent de détecter les inclusions de mHTT dans les cellules neuronales. (Figure tirée de Yu-Taeger et al., 2012)

Le graphique g correspond aux résultats du test comportemental de reconnaissance d'objet. Ici, le temps d'exploration de chaque objet (e1 et e2) est montré lorsque les rats contrôles et BACHD sont âgés de 4 et 12 mois. (Figure tirée de Abada et al., 2013)

Le marquage histologique par le biais d'anticorps EM48 ou S830 a permis de localiser des agrégats de mHTT au niveau de l'amygdale, du cortex, de l'hippocampe et du striatum à partir de 3 mois et dont la densité augmente avec l'âge. Une dégénération des neurones a également été observée dans le striatum et le cortex tout comme une démyélinisation des fibres au niveau de l'hippocampe (Yu-Taeger et al., 2012).

C. Morphologie générale des rats BACHD

L'évolution de la taille et du poids diffère entre les rats sauvages et les rats BACHD. En effet, les rats BACHD présentent généralement des signes d'obésité (Jansson et al., 2014) : même si le poids moyen des rats sauvages est similaire à celui des rats BACHD, on peut observer sur la **figure VI.9b** que la masse grasseuse est plus importante chez les BACHD. De plus, en mesurant la consommation de nourriture des deux groupes, on s'aperçoit que les rats BACHD consomment moins de nourriture que les animaux contrôles (**Figure VI.9a**). On peut donc supposer que l'augmentation de la masse grasseuse est la conséquence directe d'un déficit ou d'une modification du métabolisme du glucose dans ce modèle.

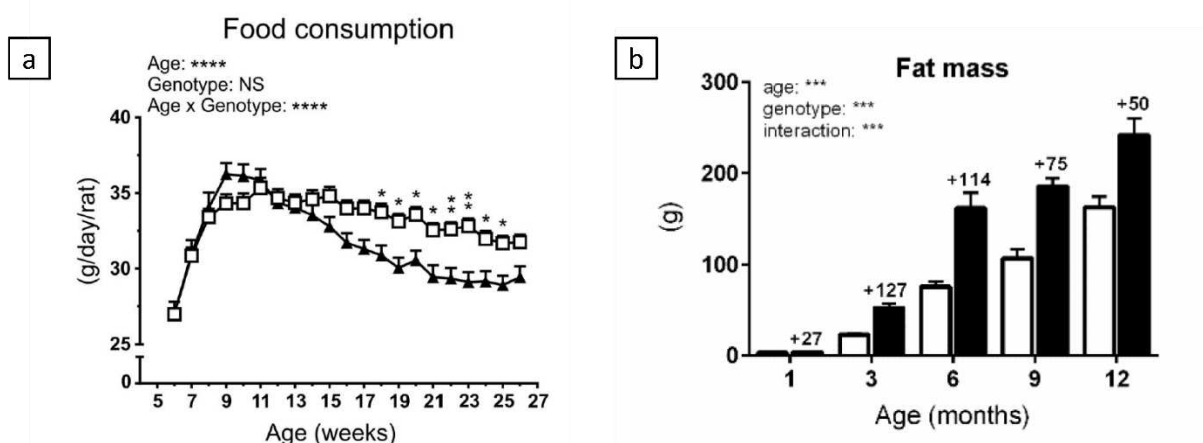


Figure VI.9 : Comparaison de la consommation de nourriture et de la masse grasseuse entre les rats contrôles (en blanc) et les rats BACHD (en noir).

- Les rats contrôles ont une consommation de nourriture plus importante que les rats BACHD à partir de 15 semaines (Figure tirée de Jansson et al., 2014)
- La masse grasseuse des rats BACHD, dès le 1^{er} mois, est plus importante que celle des rats sauvages. (Figure tirée de la thèse de Laura Emily Clemensson, 2015)

V. Protocol d'expérimentation animale

Toutes ces données acquises soit directement à MIRCen dans le cadre de cette thèse soit lors d'études précédentes tirées de la littérature sur ces 3 modèles rongeurs (KI140, R6/1 et BACHD) montrent des altérations en cohérence avec un processus évolutif de la maladie, similairement à l'évolution chez les patients atteints de la MH. Ces études comportementales et les analyses histochimiques permettent d'identifier des marqueurs pertinents de la maladie. Toutefois, ces marqueurs traditionnels restent peu prédictifs et peu précoces pour ce qui est des marqueurs identifiés grâce aux études comportementales ou extrêmement invasif pour ce qui est des marqueurs histochimiques car ils nécessitent le sacrifice des animaux. Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé des outils d'imagerie et de spectroscopie RMN afin d'identifier des biomarqueurs potentiels de la maladie. Dans cette partie, nous présentons le matériel et les méthodes utilisées pour mener à bien les protocoles IRM/SRM. L'utilisation de l'IRM, et notamment de l'imagerie CEST et de la spectroscopie RMN du proton, permet d'obtenir des informations biologiques relatives aux défauts du métabolisme cérébral impliqués dans la pathologie et ce de façon non-invasive. Cela permet en outre de suivre l'évolution des symptômes de façon longitudinale.

A. Anesthésie et suivi des paramètres physiologiques

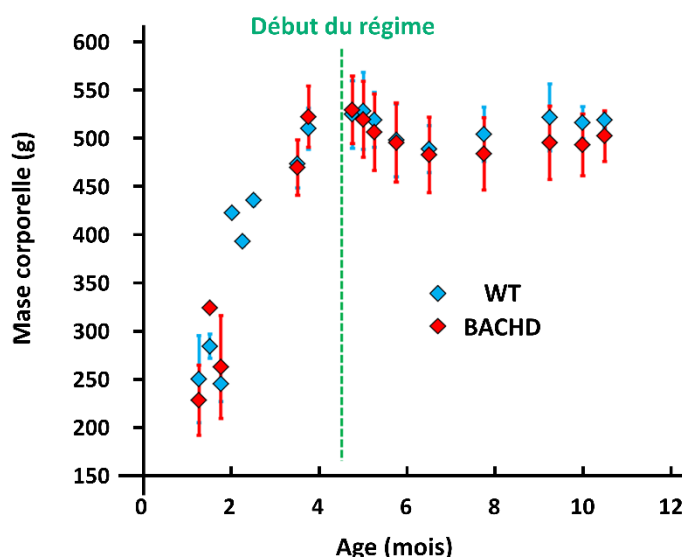
Afin d'acquérir un signal correct et d'éviter tout artéfact de mouvement, il est nécessaire que l'animal soit immobile. Pour cela, les animaux sont systématiquement anesthésiés à l'isoflurane dans un mélange air/O₂ et maintenus stables à l'aide d'un cadre stéréotaxique. L'observation du métabolisme nécessite également un suivi de différents paramètres physiologiques tels que la température corporelle de l'animal et le niveau d'anesthésie. En conséquence, les rongeurs sont maintenus à une température de 37°C grâce à un système de circuit d'eau thermorégulé. Le niveau d'anesthésie est monitoré en temps réel grâce au suivi de la fréquence respiratoire des animaux. Le niveau d'isoflurane est ajusté manuellement afin de conserver une fréquence respiratoire aux alentours de 80-90 respirations par minute pour les souris et 50-60 respirations par minute pour les rats. Ces fréquences sont obtenues grâce à des niveaux d'isoflurane compris entre 1,5% et 2,5 %. Malgré l'impact connu de l'isoflurane sur le métabolisme cérébral (Josan et al., 2013), nous avons choisi cet anesthésique pour sa facilité d'utilisation et de régulation. De plus, nous avons veillé à appliquer les mêmes doses d'isoflurane pour les groupes malades et contrôles. Ainsi, si modification du métabolisme il y a, nous faisons l'hypothèse qu'elle est comparable entre les groupes.

B. Contrôle de la masse corporelle chez le rat

Pour le cas des rats, le système en place est limité par le diamètre interne de l'antenne volumique (7 cm). Par conséquent, il est impératif de contrôler le poids des rats pour qu'ils puissent passer dans l'antenne sans risquer de suffoquer. Ainsi, une masse limite de 600 grammes a été déterminée afin d'assurer la qualité des acquisitions. Etant donné que nous avons effectué un suivi longitudinal relativement long pour les rats de la colonie BACHD, il était nécessaire de s'assurer que les rats ne dépassent pas cette limite. Ils ont pour cela suivi un régime de restriction calorique (5 croquettes par jour) afin de maintenir leur poids autour de 500-550 g (**Figure VI.10**). La figure ci-dessous présente l'évolution du poids des rats sauvages et BACHD et montre l'efficacité du régime alimentaire pour conserver une masse corporelle inférieure à 600 g.

Figure VI.10 : Courbes d'évolution de poids pour les rats contrôles (bleue) et BACHD (rouge).

Les rats ont été pesés âgés de 1 à 11 mois et ont été mis au régime à partir de 4 mois et demi.



Ces résultats obtenus sur notre colonie de rats montrent également que la prise de poids des animaux et leur réponse au régime alimentaire de restriction calorique est comparable pour les animaux sauvages et les BACHD.

Chapitre VII : L'imagerie métabolique IRM-CEST comme biomarqueur de la maladie de Huntington

Comme énoncé dans les chapitre *I* et *IV*, le glutamate est impliqué dans un certain nombre de fonctions cérébrales telles que la cognition ou la mémoire et joue un rôle prépondérant dans les mécanismes associés au métabolisme cérébral. Bien que recapté par les astrocytes pour être converti en glutamine par l'enzyme glutamine synthétase, le glutamate est considéré comme étant principalement localisé dans les neurones. Par conséquent, ce métabolite peut potentiellement constituer un bon marqueur neuronal et également un marqueur du dysfonctionnement du cycle glutamate-glutamine régissant les interactions entre neurones et astrocytes. L'utilisation traditionnelle de la SRM du proton a permis dans nombre d'études de mettre en évidence des perturbations des niveaux de glutamate, notamment dans le cadre de la maladie de Huntington. Toutefois, ces études se focalisaient pour la plupart sur le striatum qui est connu pour être particulièrement vulnérable dans la MH. Dans cette thèse, nous avons développé un protocole d'imagerie du glutamate par IRM-CEST (décrit au chapitre *III*) afin d'investiguer les perturbations de ce métabolite d'intérêt dans différentes régions du cerveau. Couplée à la SRM du proton, l'imagerie gluCEST se révèle très utile pour la caractérisation de modèles animaux de maladies neurodégénératives mais surtout pour apporter des indices pertinents sur les perturbations métaboliques dans le cerveau pathologique. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus en SRM et imagerie gluCEST dans deux modèles souris de la MH présentés dans le chapitre *VI*, à savoir les modèles R6/1 et KI140.

I. Protocole IRM

Les méthodes de RMN développées et exposées dans ce chapitre ont pour but de rechercher des biomarqueurs pertinents de la MH. Etant donné que le striatum est une des structures principalement affectées dans la MH, nous avons pris le parti d'étudier cette structure avec les outils de RMN conventionnelle dont nous disposons, à savoir la SRM et l'imagerie volumétrique. Afin de cartographier les atteintes métaboliques sans à priori régional, nous avons appliqué le protocole d'imagerie gluCEST sur plusieurs coupes de cerveau.

A. Volumétrie du striatum

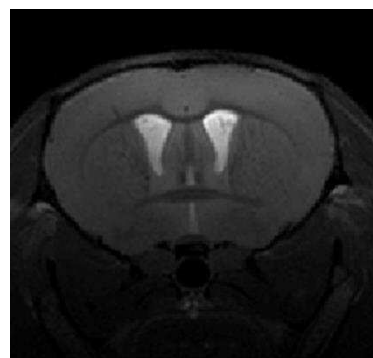
Le volume du striatum est mesuré grâce à l'acquisition d'images anatomiques de très bonne résolution ($70 \times 70 \times 300 \mu\text{m}^3$) orientées dans le plan coronal pour permettre une segmentation précise des différentes structures cérébrales. Les 25 images ont été obtenues avec l'antenne cryogénique en utilisant une séquence multi-coupes multi-échos ou MSME (de l'anglais *Multi-Slice Multi-Echos*) avec un TR de 2500 ms, 17 échos, un TE effectif de 45 ms pour un temps d'acquisition total de 8 min (**Figure VII.1**).

Figure VII.1 : Exemple d'image anatomique acquise dans le cerveau de la souris avec l'antenne cryogénique.

Séquence : MSME.

TR = 2500 ms, TE effectif = 45 ms.

Résolution : $70 \times 70 \times 300 \mu\text{m}^3$.



B. Profil métabolique du striatum

Le profil métabolique a été mesuré dans un voxel placé autour du striatum gauche et de volume $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ par SRM du proton. Les images anatomiques ont également été utilisées afin de positionner précisément le voxel (**Figure VII.2**). Nous avons pris le parti de positionner systématiquement le voxel dans le striatum gauche afin d'augmenter la reproductibilité des acquisitions et pour s'affranchir d'un potentiel biais de l'antenne. Les spectres ont été acquis grâce à l'antenne cryogénique à l'aide d'une séquence LASER (*Localization by Adiabatic SElective Refocusing*) avec un TR de 5000 ms, un TE de 20 ms et 128 répétitions pour un temps d'acquisition total d'environ 11 min. L'utilisation du logiciel LCModel a permis de quantifier la concentration des métabolites présentés dans le chapitre II (Glutamate, Glutamine, Choline, N-Acétylaspartate, Créatine, Myo-inositol et Taurine) avec une borne de Cramer-Rao (caractérisant la variance des mesures) inférieure à 5%. Le champ B_0 a été homogénéisé au sein du même voxel grâce à la routine Mapshim disponible sur le logiciel de pilotage de l'IRM PV.6.0.1. Le shim localisé a permis d'obtenir une largeur spectrale du pic de l'eau comprise entre 10,5 à 15 Hz, ce qui permet d'obtenir une excellente résolution des différents pics d'intérêt sur le spectre RMN.

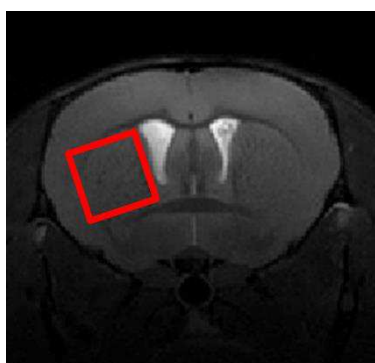


Figure VII.2 : Positionnement du voxel de spectroscopie ^1H (en rouge) autour du striatum de la souris.

C. Imagerie gluCEST

La cartographie de la distribution du glutamate a été effectuée dans différents niveaux de coupe du cerveau de souris. Un Z-spectrum complet comportant 21 images acquises sur une gamme de fréquences allant de -5 à 5 ppm (par rapport à l'eau) avec un pas de 0,5 ppm a été acquis. Bien que plus coûteux en terme de temps (21 min) que l'acquisition uniquement des images à ± 3 ppm (2 min), nous avons choisi d'acquérir un Z-spectrum complet pour trois raisons. Tout d'abord, cette méthode permet de corriger précisément les artéfacts de B_0 comme décrit précédemment dans le chapitre V. De plus, la forme globale du Z-spectrum et du MTRasym est intéressante car elle permet de s'assurer de la qualité des acquisitions mais également d'identifier des contributions potentielles de variations du pH (voir chapitre V). Enfin, l'analyse des effets CEST sur plusieurs fréquences (2.5 et 3 ppm) permet d'intégrer différentes contributions à l'effet CEST et de maximiser le rapport contraste sur bruit dans l'image gluCEST. Les paramètres de saturation utilisés ($B_1 = 5 \mu\text{T}$ et $t_{\text{sat}} = 1 \text{ s}$) ont été optimisés afin de maximiser l'observation du glutamate comme présenté dans le chapitre V. Les trois coupes, positionnées de manière à contenir le striatum, ont une résolution de $150 \times 150 \times 600 \mu\text{m}^3$. L'homogénéisation du champ B_0 (shim) a été effectuée dans un voxel placé autour du cerveau et contenant les 3 coupes (**Figure VII.3**) à l'aide de la routine Mapshim permettant de faire un shim localisé.

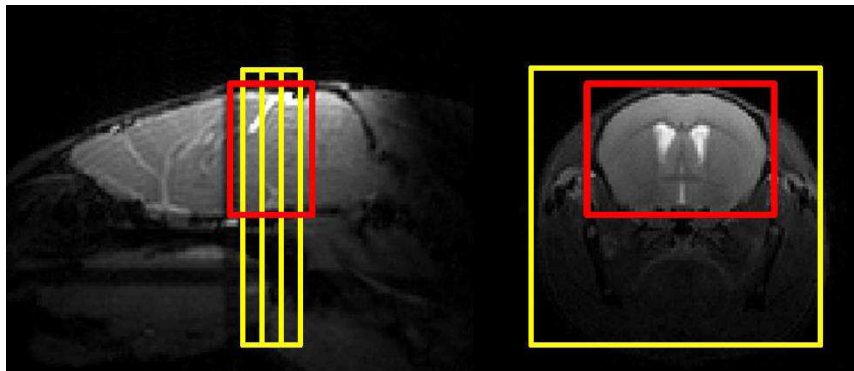


Figure VII.3 : Positionnement des voxels d'étude pour les acquisitions d'imagerie CEST.

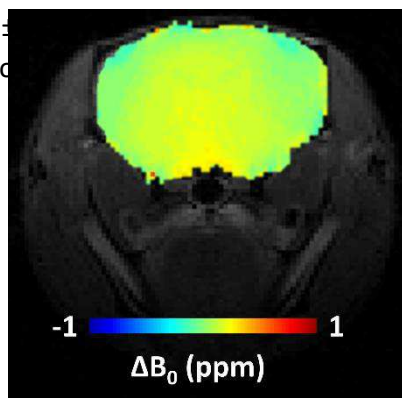
Positionnement des coupes (jaune) et du voxel de shim (rouge) sur trois coupes coronales de résolution : $150 \times 150 \times 600 \mu\text{m}^3$.

Bien que la procédure Mapshim soit très performante, elle ne permet pas d'obtenir un champ B_0 homogène sur les bords du voxel de shim ou sur les bords du cerveau. Par conséquent, les artéfacts de B_0 ont été corrigés en post-traitement grâce à la méthode WASSR décrite précédemment qui permet également de générer une carte des variations locales du champ B_0 (**Figure VII.4**). Les mesures ayant été effectuées avec l'antenne volumique en transmission, l'homogénéité du B_1 obtenue a été

jugée suffisante (l'intensité du B_1 variant de 1 à 5 – voir chapitre V) pour ne pas apporter de biais en post-traitement.

Figure VII.4 :

Cartographie des inhomogénéités du champ B_0 dans le cerveau d'une souris.



II. Altération du métabolisme cérébral dans le modèle KI140

A. Modifications morphologiques du striatum

Le volume striatal est un des marqueurs les plus pertinents dans le cadre de la MH. En effet, l'atrophie du striatum est quasiment systématiquement observée chez les patients souffrant de la MH (Bates et al., 2015; Harris et al., 1996) ainsi que chez les modèles rongeurs (Boussicault et al., 2014; Lerch et al., 2008). En connaissant la résolution des images, nous avons pu mesurer le volume du striatum chez les souris KI140 en segmentant manuellement cette structure sur les images anatomiques (**Figure VII.5a**). Nous avons ainsi pu mettre en évidence une variation du volume striatal moyen en fonction du génotype : $18,7 \pm 0,7 \text{ mm}^3$ pour les souris sauvage, $16,8 \pm 0,7 \text{ mm}^3$ pour les hétérozygotes et $14,8 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ pour les homozygotes. Nous observons donc une diminution significative de -20,9 % chez les homozygotes. Une diminution du volume striatal de -10,1 % a été observée chez les hétérozygotes mais reste non significative (**Figure VII.5b**) Ce qui peut notamment s'expliquer par la taille limitée de la cohorte.

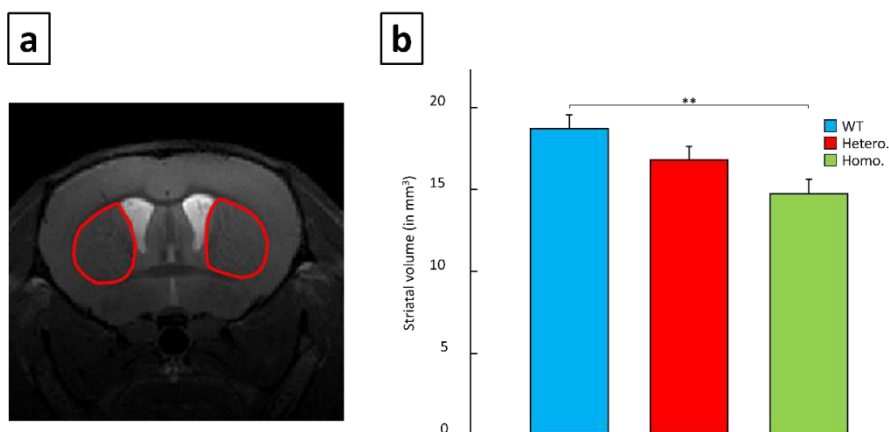


Figure VII.5 : Volumétrie du striatum chez les souris KI140.

- Segmentation manuelle à partir d'images IRM anatomiques de haute résolutions ($70 \times 70 \times 300 \mu\text{m}^3$)
- Résultats obtenus après calcul du volume du striatum pour les contrôles ($n = 5$, en bleu), les hétérozygotes ($n = 5$, en rouge) et les homozygotes ($n = 5$, en vert).

Ces changements macroscopiques semblent montrer une aggravation du phénotype en fonction du génotype des souris. En effet, on peut faire l'hypothèse que l'expression de la maladie est plus forte chez les souris homozygotes que chez les hétérozygotes, ce qui est compatible avec les résultats obtenus en analyse comportementale et en histologie (voir chapitre **VI**). Il a également été démontré qu'il existait une corrélation entre l'atrophie du striatum et le nombre de répétitions du triplet CAG qui reflète donc la sévérité de la MH (Ruocco et al., 2006).

Bien que très intéressante et renseignant sur l'évolution de la maladie, cette mesure macroscopique ne révèle néanmoins aucune information concernant les dégradations biologiques à l'origine de cette atrophie. De plus, on peut raisonnablement penser que ces altérations sont en fait le reflet à long terme de modifications biologiques ou métaboliques plus précoces. Par conséquent, l'utilisation de la spectroscopie RMN et de l'imagerie gluCEST pour la recherche d'altérations plus fonctionnelles permet d'apporter des renseignements complémentaires précieux à l'étude des défauts du métabolisme énergétique, potentiellement à l'origine de ces changements.

B. Etude du profil métabolique du striatum

1. Détection du dysfonctionnement neuronal

Nous avons acquis des spectres ^1H dans le striatum des souris KI140 âgées de 12 mois afin de mesurer les modifications métaboliques liées au génotype. La **figure VII.6** présente un exemple de spectre pour chacun des groupes de souris. On peut juger ici de la qualité des acquisitions avec le très bon rapport signal-à-bruit et la très bonne résolution des différents pics des métabolites.

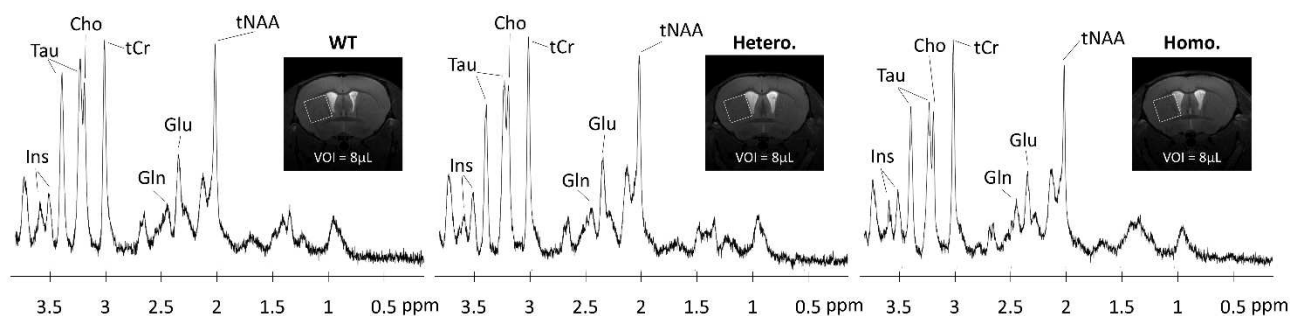
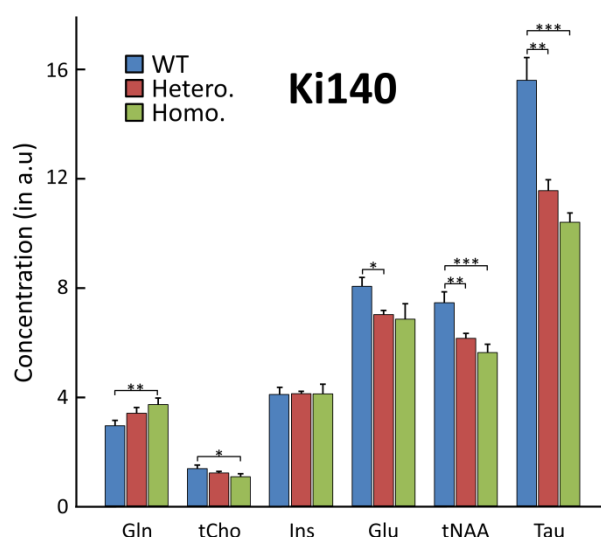


Figure VII.6 : Exemples de spectre proton acquis dans un voxel de 8 μL dans le striatum gauche pour chaque groupe de souris (WT à gauche, hétérozygotes au milieu et homozygotes à droite).

Les concentrations relatives par rapport à la créatine ont été mesurées pour chacun des métabolites et moyennés pour chaque groupe de souris afin d'obtenir le profil métabolique relatif à chaque génotype (**Figure VII.7**). On observe ainsi des réductions significatives des niveaux de Taurine (respectivement -25,9 % (p-value : 0,03) et -33,3 % (p-value : 0,0002) chez les souris hétérozygotes et homozygotes comparées aux souris sauvages) et de tNAA (respectivement -17,4 % et -24,3 % pour des p-value de 0,009 et 0,0007). Une diminution significative de glutamate est également détectée chez les hétérozygotes (-13 % par rapport aux contrôles) ainsi qu'une tendance similaire pour les homozygotes (-14,9 %) (**Figure VII.7**). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de la taurine dans le métabolisme cérébral telles que la neurotransmission ((Foos and Wu, 2002), l'osmorégulation (Law, 1998) ou la neuroprotection (Tadros et al., 2005). Ainsi, la diminution de taurine peut être interprétée comme une altération de ces processus de régulation dans le cerveau des souris Huntington. La réduction de Glu et tNAA, considérés comme des marqueurs neuronaux (Gill et al., 1989; Simmons et al., 1991), suggère une dégradation de l'intégrité des cellules neuronales et de leurs fonctions. L'altération du niveau de tNAA peut être liée à des déficits énergétiques dus à des dysfonctionnements du métabolisme mitochondrial. La baisse de Glu, même si ce n'est qu'une tendance pour les homozygotes, peut être corrélée à une détérioration des mécanismes impliqués dans le cycle de Krebs comme il a été démontré sur des animaux injectés avec la toxine 3NP (Dautry et al., 1999 - Dautry et al., 2000).

Figure VII.7: Profils métaboliques mesurés par Spectroscopie H^1 pour les souris sauvages (bleu), hétérozygotes (rouge) et homozygotes (vert).

Les concentrations de métabolites ont été normalisées par le signal de la créatine totale établie à 8 mM. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA unilatéral (p-values : *** < 0,001 ; ** < 0,01 ; * < 0,05)



2. Modification du métabolisme astrocytaire

Nous avons aussi pu discerner une augmentation de la concentration de glutamine (+27,4 %, p-value : 0,01) et une baisse de la choline totale (-21,7 %, p-value : 0,03) chez les homozygotes. La même tendance est observée chez les hétérozygotes mais de façon moins importante et non significative. L'altération de la concentration de Gln, considérée comme un marqueur des cellules astrocytaires (Brand et al., 1993), peut être interprétée comme une réaction de ces cellules à une légère inflammation des tissus cérébraux des souris.

La diminution de la concentration des métabolites neuronaux et l'augmentation du niveau des métabolites astrocytaires est une configuration régulièrement observée dans les maladies neurodégénératives et notamment la MH. Effectivement, les précédentes études mesurant le profil métabolique par SRM du proton dans des modèles sévères comme les R6/2 (Tkac et al., 2012) ou plus progressifs tels que les Q111 (Menalled et al., 2009) ont montré une hausse de Gln et une réduction de tNAA. Une étude ne fait cependant pas état d'une modification de la concentration de tNAA qui peut s'expliquer par l'âge précoce (13 semaines) auquel les souris ont été scannées. Une diminution systématique des niveaux de Glu et Tau sont également observés chez les souris Q111 (Tkac et al., 2012) alors que seul une baisse de Glu n'est observée chez les R6/2 (Jenkins et al., 2005). Le modèle Q111 semble avoir une évolution similaire au modèle KI140 dans la mesure où il s'agit d'un modèle Knock-In dont le développement des symptômes se fait de manière plus progressive que chez les modèles transgénique tels que les R6/2. Néanmoins, les profils métaboliques acquis dans ces modèles souris semblent mettre en évidence un déséquilibre dans les interactions neurones/astrocytes venant perturber le cycle glutamate-glutamine qui a un rôle central dans la régulation des rapports énergétiques entre neurones et astrocytes. La diminution de la concentration de Glu observée par Spectroscopie ^1H montre bien que le modèle KI140 est un candidat intéressant pour l'application de l'imagerie gluCEST.

C. Cartographie de la distribution du glutamate par imagerie gluCEST

1. Mesures individuelles de l'effet gluCEST

L'acquisition de ces images a été effectuée sur trois coupes centrées sur le striatum. On peut s'apercevoir sur la **figure VII.8** que le contraste détecté est comparable pour les trois coupes d'un même animal, ce qui confirme une fois de plus l'homogénéité de la saturation. L'homogénéité du champ B_0 a également été vérifiée pour cette étude à partir des images WASSR : le décalage fréquentiel moyen observé dans le cerveau des souris KI140 est de $0,03 \pm 0,03$ ppm.

Les images CEST présentées en **figure VII.8** ont été acquises pour une souris de chaque groupe. On remarque ainsi que le contraste gluCEST global paraît être plus faible chez les souris Huntington comparées aux souris sauvages. De façon intéressante, il semble même que cette réduction de signal soit plus importante chez les homozygotes que chez les hétérozygotes ce qui peut s'expliquer par la plus grande sévérité du génotype.

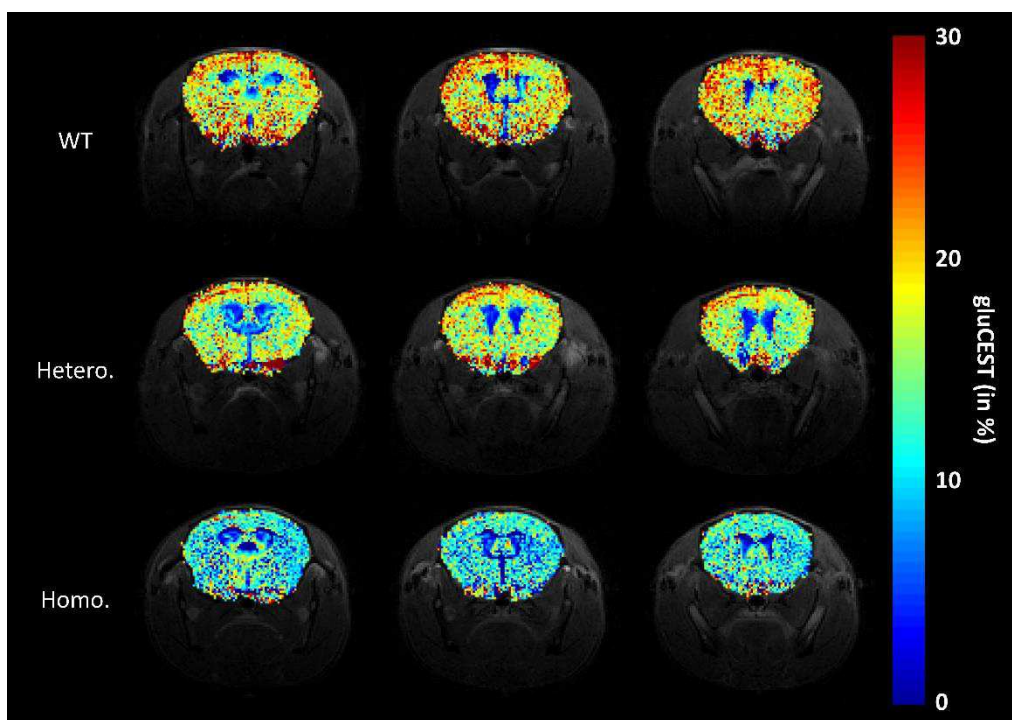


Figure VII.8 : Exemples d'images gluCEST acquises chez les souris KI140.

Images gluCEST sur trois coupes centrées sur le striatum pour les 3 génotypes (souris sauvages, hétérozygotes et homozygotes). Les images ont été calculées en moyennant le signal CEST entre 2 et 3 ppm.

Afin de mesurer le contraste gluCEST dans le striatum, nous avons moyenné le signal provenant de l'ensemble des pixels contenus dans une région d'intérêt délimitée manuellement sur les images anatomiques. Le calcul des Z-spectra et MTRasym moyens du striatum confirme bien l'observation faite précédemment sur les images individuelles (**figure VII.8**) : le signal gluCEST est plus intense chez les contrôles que les souris Huntington avec une valeur intermédiaire au contraste mesuré pour les deux autres groupes (**figure VII.9**). Il est également intéressant de noter que les différences constatées sur les courbes MTRasym (**figure VII.9**, partie droite) s'expliquent par les différences sur les Z-spectrum dans la zone +2 à +5 ppm (**figure VII.9**, partie gauche). En effet, les effets CEST mesurés pour les saturations négatives sont comparables entre les souris, ce qui suggère que les variations d'effets CEST ne sont pas dues à des modifications du contraste endogène des macromolécules par exemple.

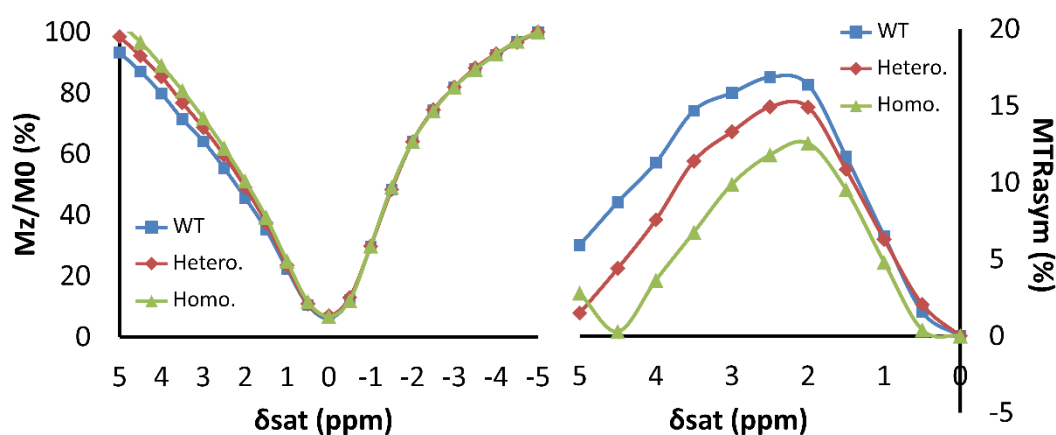


Figure VII.9 : Z-spectra (gauche) et MTRasym (droite) moyens dans le striatum pour chaque génotype (souris sauvages en bleu, hétérozygotes en rouge et homozygotes en vert).

2. Effet du génotype sur le contraste gluCEST

Dans le but de rendre compte des variations des effets CEST entre les 3 groupes de souris, nous avons calculé les effets CEST moyens au sein de chaque cohorte d'animaux. Par ailleurs, afin de tirer profit de la bonne résolution spatiale offerte par l'imagerie CEST, nous avons segmenté manuellement le cerveau de chaque souris en huit régions d'intérêt présentées sur la **figure VII.10** : le striatum, le corps calleux, les cortex moteur, piriforme et somatosensoriel, l'hypothalamus, les noyaux septaux et la substantia innominata.

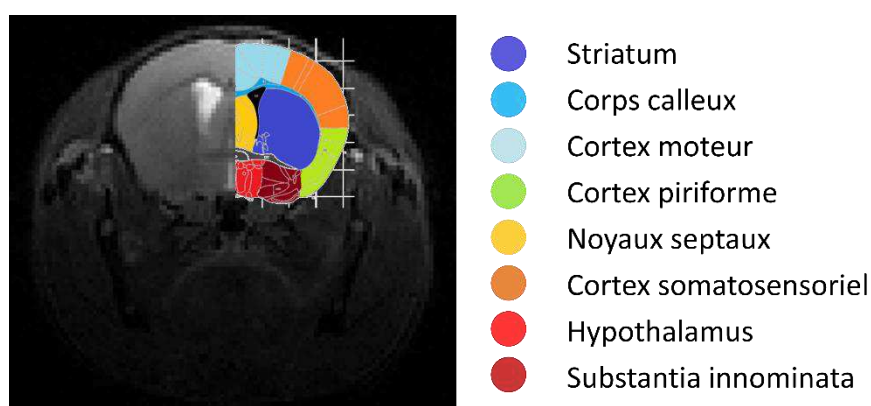


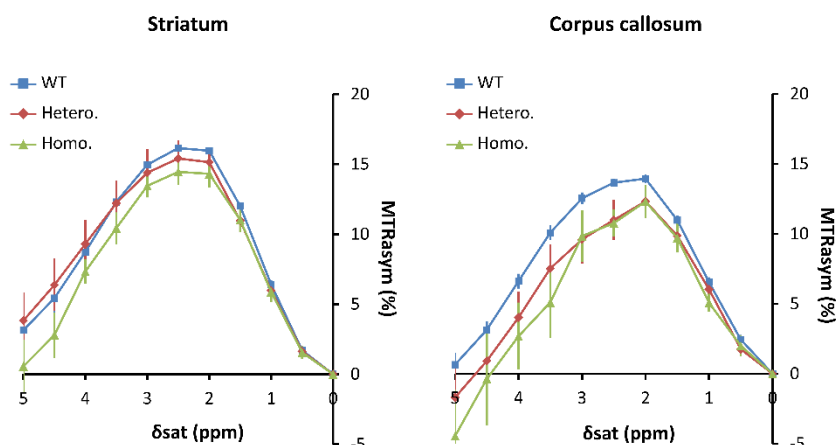
Figure VII.10 : Segmentation du cerveau en 8 régions d'intérêt.

La mesure de l'effet gluCEST moyen dans chaque région va permettre de déterminer les structures du cerveau les plus affectées dans ce modèle.

Ainsi, en comparant le signal obtenu dans la substance blanche (corps calleux) et la substance grise (striatum) des souris sauvages, on observe un contraste plus intense dans la matière grise que dans la matière blanche (**figure VII.11**). En effet, la concentration en glutamate est environ 30 % plus élevée dans la matière grise que dans la matière blanche (Cai et al., 2012), ce qui est cohérent avec nos observations en imagerie gluCEST.

Figure VII.11 :

Comparaison des effets MTRasym moyens mesurés dans le striatum (gauche) et le corps calleux (droite) pour chaque groupe de souris (souris sauvages en bleu, hétérozygotes en rouge et homozygotes en vert)



Les résultats ci-dessus montrent très clairement que les variations du niveau de glutamate n'est pas homogène entre le striatum et le corps calleux. On constate également que l'atteinte métabolique n'est pas la même en fonction du génotype. Afin de faciliter la lecture de ces résultats, nous avons mis au point une méthode permettant de cartographier les variations d'effets CEST entre les animaux modèles de la MH et les animaux contrôle (Pépin et al., 2016). Pour cela, nous avons généré des cartes de variation du signal gluCEST moyen mesuré dans chaque région d'intérêt. Ces cartes, exprimées en pourcentage, sont calculées à partir des changements observés par rapport aux souris sauvages avec la formule suivante :

$$Variation = 100 \cdot \frac{MTR_{asym}(WT) - MTR_{asym}(KI140)}{MTR_{asym}(WT)} \quad (VII.1)$$

(Les variations ainsi que les p-values pour chacune des structures étudiées sont résumées dans le **tableau VII.1**).

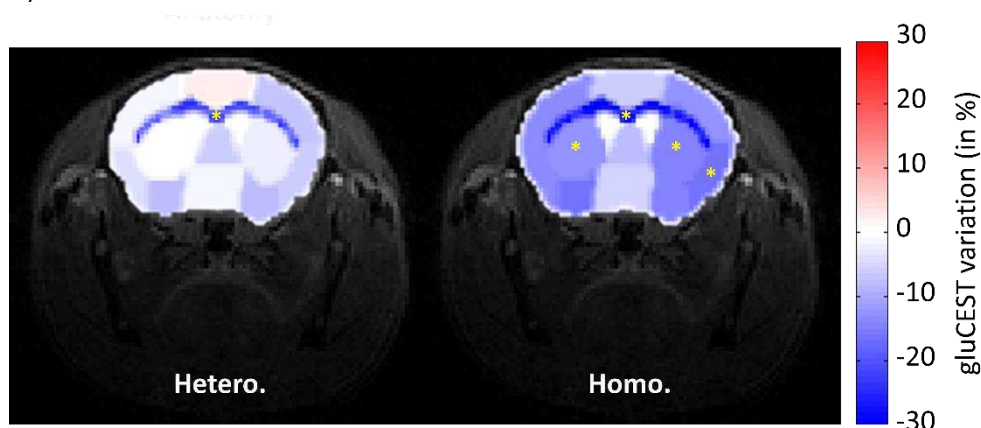


Figure VII.12 : Cartes de variations du contraste gluCEST par rapport aux souris sauvages pour les souris KI140 hétérozygotes (à gauche) et homozygotes (à droite).

Une diminution plus forte est observée chez les souris homozygotes et est même significative dans le striatum, le cortex piriforme et le corps calleux (selon un test statistique ANOVA unilatéral avec des p-values seuillées à 0,05 (*)). Le corps calleux semble la zone la plus atteintes pour les deux génotypes.

La cartographie des variations du signal gluCEST pour chaque groupe de souris est présentée sur la **figure VII.12** et confirment donc la réduction plus prononcée du contraste chez les homozygotes corrélée à une plus forte sévérité des symptômes pour ce génotype. Tout d'abord, on constate une diminution significative du contraste de 10,7 % et de 12,7 % pour les parties gauche et droite du striatum chez les souris homozygotes et une tendance similaire mais plus faible chez les hétérozygotes (-0,3% et -4,3%, respectivement). Le même pattern est observé pour les parties gauche et droite du cortex piriforme (respectivement -11% et -14% avec des p-values de 0,078 et 0,015) chez les homozygotes alors que les hétérozygotes ne montrent pas de baisse significative du niveau de glutamate. De manière générale, les variations des parties droite et gauche sont comparables et permettent ainsi de s'assurer que les données ne sont pas altérées par un biais dû à l'antenne ou à l'acquisition (si l'animal bouge par exemple).

Le résultat le plus surprenant concerne les variations d'effets CEST mesurées dans le corps calleux des animaux qui semble être la structure la plus affectée chez ce modèle avec des variations de contraste gluCEST significatives de -21,8% ($p = 0,033$) pour les hétérozygotes et -28,4% ($p = 0,03$) pour les homozygotes.

	WT vs. Hetero.		WT vs. Homo.		WT ₁ vs. WT ₂	
	gluCEST variation (in %)	p-value	gluCEST variation (in %)	p-value	gluCEST variation (in %)	p-value
Left Striatum	-0.3	0.970	-10.7	0.040	2.0	0.779
Right striatum	-4.3	0.689	-12.7	0.056	2.7	0.592
Corpus Callosum	-21.8	0.033	-28.4	0.030	-1.0	0.879
Septal Nuclei	-4.8	0.676	-7.0	0.414	-3.6	0.503
Motor cortex	1.6	0.884	-4.7	0.468	1.8	0.845
Left Piriform Cortex	-3.4	0.721	-11.0	0.078	-2.1	0.665
Right Piriform Cortex	-5.6	0.572	-14.0	0.015	-1.5	0.725
Left Somatosensory Cortex	1.5	0.888	-11.1	0.198	0.0	0.996
Right Somatosensory Cortex	-6.5	0.565	-10.3	0.329	0.3	0.973
Left Substantia innominata	-7.5	0.446	-14.2	0.141	-3.6	0.539
Right Substantia innominata	-6.7	0.502	-12.0	0.174	0.0	0.997
Hypothalamus	-1.0	0.912	-4.3	0.460	4.0	0.363

Tableau VII.1 : Tableau des valeurs de variations du contraste gluCEST chez les souris KI140.

Variations calculées par rapport aux souris sauvages pour les hétérozygotes (colonnes de gauche), pour les homozygotes (colonnes centrales) et enfin entre 2 groupes de WT (colonnes de droite) selon la formule (VII.1).

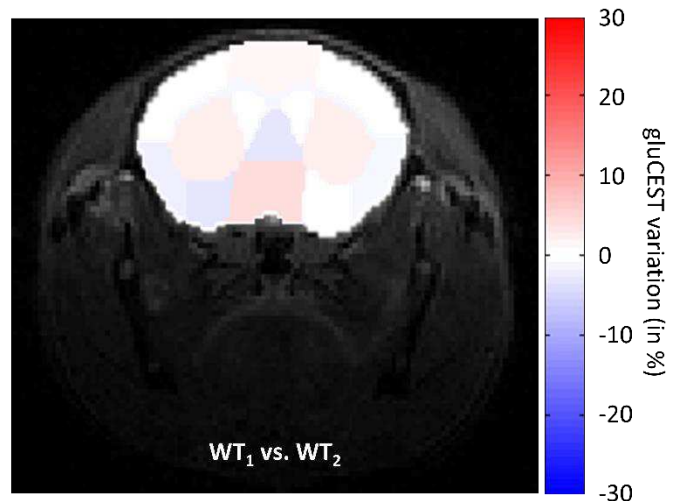
La significativité statistique a été établie par un test ANOVA unilatéral avec un seuillage défini par les p-values : *** < 0,001 ; ** < 0,01 ; * < 0,5.

3. Evaluation du seuil de détection de l'effet gluCEST *in vivo*

Afin de s'assurer de la reproductibilité et la précision de ces mesures par imagerie gluCEST, nous avons réalisé une étude complémentaire en effectuant les mêmes acquisitions sur huit souris sauvages, divisées en deux groupes de façon aléatoire. Nous avons ensuite généré les cartes de variations d'un groupe (WT₁) par rapport à l'autre (WT₂). On constate alors que la carte de variation des effets gluCEST entre ces deux groupes contrôles ne présente que des variations faibles et non-spécifiques pour l'ensemble des structures (**Figure VII.9**). La variation la plus importante est de 4 % et a été observée dans l'hypothalamus ($p = 0,363$). Ainsi, on peut considérer que ces variations sont dues au bruit de mesure et le seuil de 4% peut être considéré comme la limite de détection du contraste gluCEST pour notre méthode. Cette étude complémentaire renforce également la véracité des résultats obtenus avec les souris HD.

Figure VII.13 : Carte de variations du signal gluCEST entre 2 groupes de souris sauvages.

Les variations du contraste gluCEST ont été mesurées dans 8 régions d'intérêt du cerveau de deux groupes de 4 souris sauvages.



4. Interprétation des résultats d'imagerie gluCEST

A l'instar de nombreux précédents travaux illustrant une altération du striatum chez des patients souffrant de la MH (Harper et al., 1991), les résultats obtenus pour ces souris font état d'un contraste gluCEST plus faible dans cette région chez les souris Huntington que chez les contrôles. De façon intéressante, grâce à l'excellente résolution spatiale de l'imagerie CEST, cette réduction de glutamate est détectée dans presque toutes les structures du cerveau et est plus forte chez les homozygotes que chez les hétérozygotes.

a) Le corps calleux, une région particulièrement vulnérable dans la MH

Le résultat le plus inattendu concerne une structure composée majoritairement de fibres axonales : le corps calleux. En effet, les deux groupes de souris Huntington présentent une forte altération significative de la concentration de glutamate dans cette structure (-21,8 % pour les hétérozygotes et -28,4 % pour les homozygotes). Le corps calleux est assez peu étudié dans la MH. Néanmoins, quelques études ont démontré une dégradation de la matière blanche aux stades précoces de la maladie notamment par la détection de changements morphologiques chez des patients (Rosas et al., 2006 – Weaver et al., 2009) ou dans des modèles souris de la MH (Lerch et al., 2008 – Lerner et al., 2012). L'utilisation du DTI (*Diffusion Tensor Imaging*) sur des patients souffrant de la MH a également mis en évidence une variation des paramètres de diffusion tels que l'anisotropie fractionnelle ou la diffusivité radiale dans le corps calleux et ce, plusieurs années avant l'apparition des premiers changements morphologiques (Rosas et al., 2010). Cette variation est associée à un dysfonctionnement des axones neuronaux et notamment de la myélinisation et semble survenir avant la mort neuronale. L'altération de la concentration de Glu provient de changements précoces dans le métabolisme énergétique cérébral entraînant des mécanismes compensatoires permettant de maintenir l'homéostasie et peut également refléter la mort des cellules neuronales.

Le corps calleux relie les deux hémisphères du cerveau et joue un rôle important pour des fonctions telles que la coordination des mouvements. Son altération pourrait donc être en lien avec les désordres moteurs rencontrés chez les patients de la MH et d'autres maladies neurodégénératives (Teipel et al., 2002; Wiltshire et al., 2005).

b) Atteinte du système olfactif

Une diminution du contraste gluCEST plus importante que dans le striatum a été remarquée dans le cortex piriforme (-11 % pour les hétérozygotes et -14 % pour les homozygotes) et avec même la significativité statistique pour les homozygotes. Il est intéressant de noter que cette structure est le siège notamment des fonctions olfactives. Or il a été démontré que les patients de la MH éprouvent des difficultés à discerner les odeurs, même à un stade précoce de la pathologie (Lazic et al., 2007; Moberg et al., 1987). De plus, de précédentes études chez ce modèle souris KI140 ont fait état d'un grand nombre d'inclusions d'agrégats de protéine Htt mutée dans le cortex piriforme ce qui renforce l'hypothèse d'une atteinte du système olfactif de ces souris. S'il peut être compliqué de démontrer des atteintes au niveau olfactif pour ces souris, il est intéressant d'observer des variations d'effets CEST importante dans cette région spécifique du cerveau des animaux modèles de la MH.

c) Contribution des protons amines environnants

Dans un système biologique, un grand nombre de molécules cohabitent et interagissent entre elles. Ainsi, il existe d'autres métabolites échangeant des protons $-NH_2$ avec l'eau qui seront également affectés par la saturation et apporteront par conséquent une certaine contribution au signal CEST mesuré. La participation des principaux métabolites concernés que sont la créatine et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) au signal gluCEST est toutefois assez faible : on estime la contribution du signal provenant des protons du glutamate à environ 70 % (Cai et al., 2012).

III. Altération du métabolisme cérébral dans le modèle R6/1

Les résultats obtenus en imagerie gluCEST dans un modèle progressif de la MH nous ont permis de mettre en évidence des variations significatives du niveau de glutamate dans certaines régions du cerveau, en particulier dans le corps calleux. De plus, les variations de profils métaboliques mesurés dans les modèles souris de la MH suggèrent des atteintes du compartiment neuronal associées à de probables réorganisations du métabolisme énergétique. Durant cette thèse, nous avons également eu l'opportunité d'évaluer la pertinence de notre protocole sur un modèle souris plus sévère de la MH : le modèle R6/1 (se référer au chapitre **VI** pour une description plus détaillée)

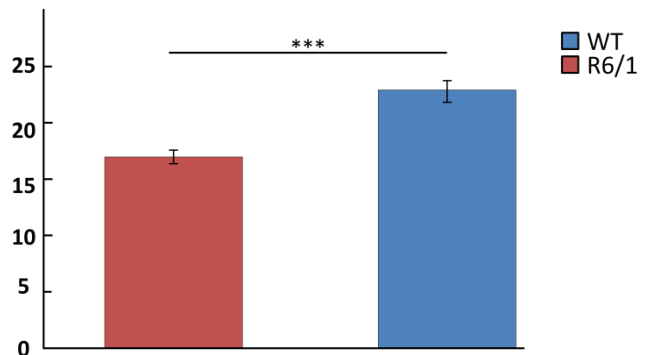
A. Analyse des marqueurs traditionnels

Comme pour les KI140, nous avons mesuré le volume du striatum à partir des images anatomiques acquises dans le cerveau des souris R6/1. Nous avons pu ainsi mesurer une diminution significative du volume striatal de 25,7 % (p-value : 0,0002) chez ces souris.

Figure VII.14 : Volumétrie du striatum chez les souris R6/1.

Résultats obtenus après calcul du volume du striatum pour les souris sauvages (en bleu) et les R6/1 (en rouge).

P-value : *** < 0,0002



Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus avec les KI140 démontrant une atrophie du striatum chez les souris et patients Huntington.

B. Mesure des concentrations de métabolites dans le striatum

Un exemple de spectres RMN proton acquis dans le striatum gauche des souris sauvages et R6/1 ainsi que l'ajustement obtenu grâce au logiciel LCModel sont présentés sur la **figure VII.15**. On constate sur cet exemple particulier une baisse importante du tNAA.

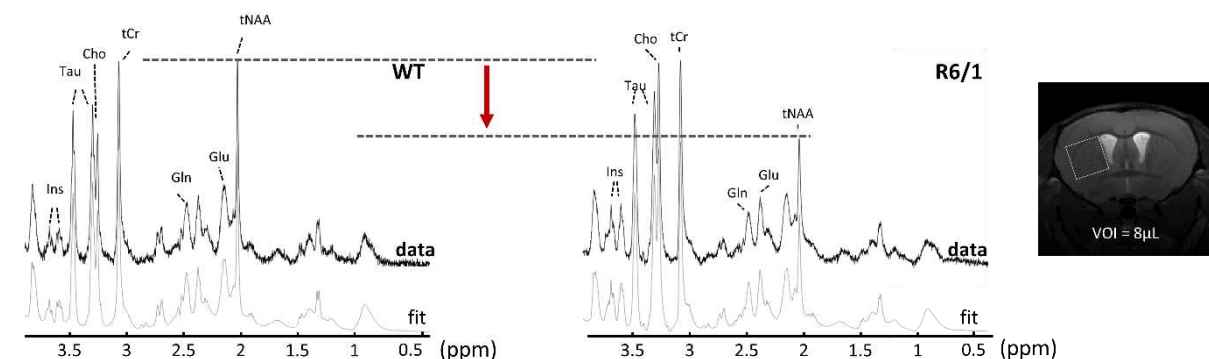
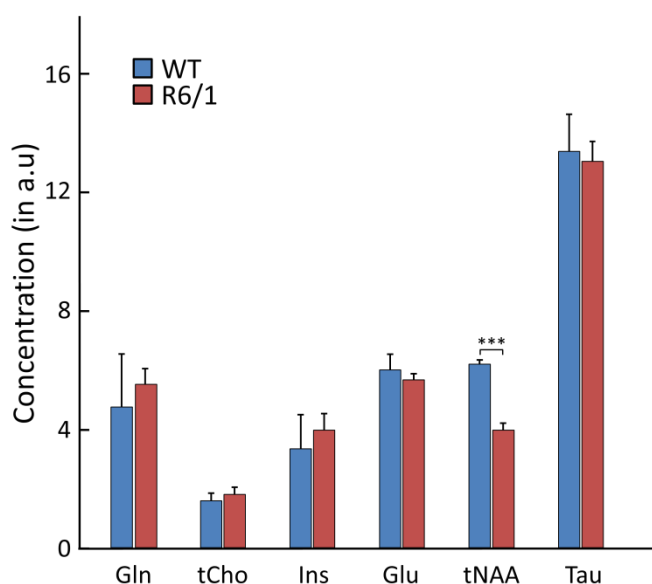


Figure VII.15 : Exemples de spectre proton acquis dans un voxel de 8 µL dans le striatum gauche pour chaque groupe de souris (souris sauvages à gauche et R6/1 à droite).

Les concentrations relatives par rapport à la créatine ont été mesurées pour chacun des métabolites et moyennées pour chaque groupe de souris afin de comparer les profils métaboliques des souris R6/1 par rapport aux souris contrôles. Comme pressenti avec l'exemple ci-dessus, les souris R6/1 présentent une baisse significative du tNAA (36 %, p-value < 0,001) par rapport aux souris contrôles. Etant donné que le tNAA est un métabolite neuronal et qu'il est considéré comme un marqueur pertinent des neurones, il est raisonnable de penser que les souris R6/1 présentent une altération de ces cellules. Ceci est cohérent avec l'atrophie du striatum mesurée sur les images anatomiques. En revanche, hormis cette baisse significative de tNAA, aucune autre différence significative n'a été mesurée chez les souris R6/1 (**figure VII.16**). On peut néanmoins observer une tendance non significative (probablement due au faible nombre d'animaux utilisés : 3 contrôles et 4 R6/1) à l'augmentation pour la Gln et l'Ins chez les R6/1 qui traduit probablement une réponse astrocytaire à la dégradation des cellules neuronales, indiquée par la variation de tNAA.

Figure VII.16 : Profils métaboliques mesurés par Spectroscopie ¹H pour les souris sauvages (bleu) et R6/1 (en rouge).

Les concentrations de métabolites ont été normalisées par le signal de la créatine totale établie à 8 mM. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA unilatéral (p-values :



De façon surprenante et malgré la forte baisse de tNAA, la concentration en Glu semble stable dans le striatum des souris R6/1. Ce résultat est cohérent avec des études déjà publiées dans la littérature utilisant un modèle de souris R6/2 assez proche. En effet, ces études ont démontré que la concentration en Glu restait stable dans les souris R6/2 dans le striatum et le cortex alors que la concentration en tNAA était fortement diminuée (Tkac et al., 2012 – Zacharoff et al., 2012).

C. Variation de la distribution du glutamate dans le cerveau

Nous avons mesuré l'effet gluCEST dans le cerveau des souris R6/1 en réalisant à nouveau une analyse dans les 8 régions d'intérêt définies précédemment pour les KI140 dans la partie II.C.2. Naturellement, nous avons cherché à comparer le signal gluCEST mesuré dans le striatum et le corps calleux afin de confronter les résultats observés chez les R6/1 et chez les KI140. Dans le cas des R6/1, aucune différence de contraste gluCEST n'est observée dans ces deux structures par rapport aux souris sauvages (**Figure VII.17**).

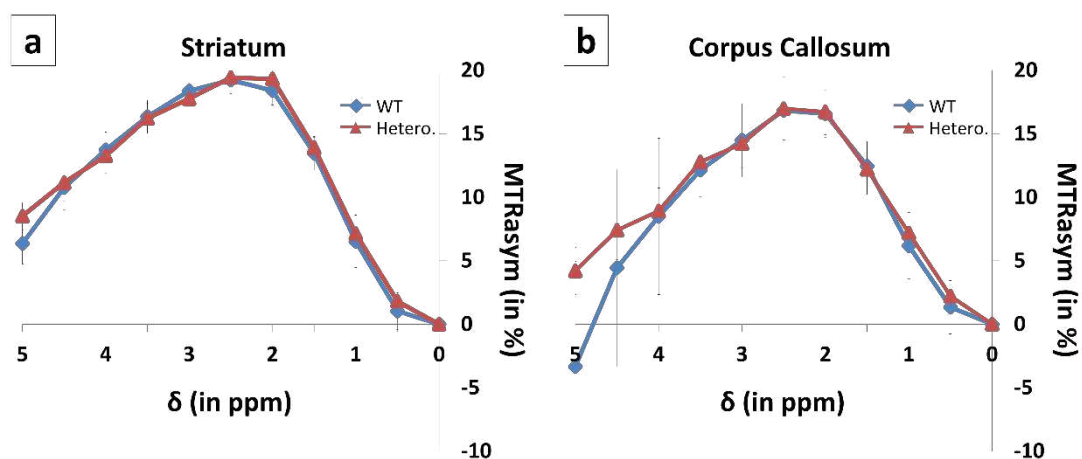


Figure VII.17 : Effets MTRasym moyens dans le striatum (à gauche) et le corps calleux (à droite).

Comparaison des effets MTRasym mesurés chez les R6/1 (en rouge) et les souris sauvages (en bleu).

Le calcul de la carte des variations de l'effet gluCEST entre R6/1 et contrôles confirme les observations effectuées dans le striatum et le corps calleux : aucune structure ne semble présenter d'altération de la concentration de Glu (**Figure VII.18**). La variation la plus importante a été mesurée dans le cortex somatosensoriel gauche et est de 2,4 % (la totalité des variations calculées dans les différentes régions sont reportés dans le **tableau VII.2**). Cette variation correspond probablement au bruit de mesure et est comparable au bruit estimé sur la carte de variation présentée sur la **figure VII.17** entre deux groupes de souris contrôles. Ces résultats sont cohérents avec le profil métabolique mesuré par spectroscopie proton qui ne montre aucune variation de glutamate entre les deux groupes.

Figure VII.18 : Carte de variations du signal gluCEST entre les souris sauvages et R6/1.

Les variations du contraste gluCEST ont été mesurées dans 8 régions d'intérêt du cerveau de souris sauvages et R6/1. On remarque que le signal gluCEST est similaire pour les deux groupes (la variation la plus importante ne dépassant pas les 2,4 %).

Les valeurs de ces variations pour chaque structure sont récapitulées dans le **tableau VII.2**.

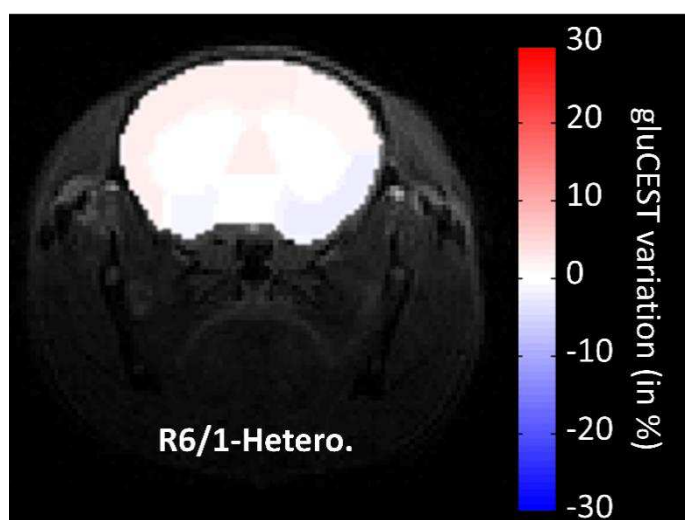


Tableau VII.2 : Tableau des valeurs de variations du contraste gluCEST chez les souris R6/1.

Variations calculées par rapport aux souris sauvages pour les souris R6/1 dans chacune des 8 structures du cerveau définies manuellement.

p-values : *** < 0,001 ; ** < 0,01 ; * < 0,5.

	WT vs. R6/1.	
	gluCEST variation (%)	p-value
Left Striatum	-0.6	0.921
Right striatum	0.1	0.984
Corpus Callosum	1.6	0.928
Septal Nuclei	2.2	0.881
Motor cortex	2.2	0.628
Left Piriform Cortex	2.0	0.652
Right Piriform Cortex	-2.3	0.560
Left Somatosensory Cortex	2.4	0.746
Right Somatosensory Cortex	1.6	0.796
Left Substantia innominata	-1.8	0.754
Right Substantia innominata	-1.9	0.676
Hypothalamus	-0.9	0.890

IV. Discussion générale

L'étude de deux modèles souris de la MH, à savoir les souris KI140 et R6/1 permet de se rendre compte de la difficulté de générer un modèle animal caractéristique d'une pathologie. Les deux modèles présentent des symptômes similaires classiques de la MH comme l'altération morphologique du striatum (atrophie). Cependant, les altérations plus fonctionnelles, notamment liées au métabolisme énergétique, témoignent quant à eux de la grande variabilité de ces modèles animaux.

A. Mise en évidence des altérations cellulaires spécifiques

La baisse de tNAA mesurée par SRM et l'atrophie du striatum chez les R6/1 semble indiquer une souffrance neuronale caractérisée notamment par des modifications de la morphologie des cellules et pouvant aboutir à une mort neuronale. Le métabolisme énergétique paraît cependant peu altéré : en effet, les concentrations de glutamate et glutamine restent relativement stable chez les R6/1.

Les résultats concernant les souris KI140 font vraisemblablement état d'une mort neuronale avec la diminution du niveau de tNAA mais semble également mettre en évidence des dérèglements métaboliques de par les différences de profils métaboliques mesurés en fonction du génotype. L'observation de ces changements est probablement possible dans le modèle KI140 car il s'agit d'un modèle plus progressif que les R6/1 et pour lequel les cellules ont le temps de s'adapter et de mettre en place des mécanismes de compensation pour palier à ces défauts du métabolisme.

Pour conclure, le tNAA et le Glu sont bien des marqueurs neuronaux mais semblent apporter des informations différentes sur l'état des neurones. Le tNAA pourrait ainsi être considéré comme un marqueur de l'intégrité neuronale alors que le Glu semblerait plutôt mettre en évidence des changements dans le métabolisme énergétique des cellules qui sont probablement issus d'une réorganisation du métabolisme afin de compenser les défauts engendrés par les cellules défaillantes. Ces interprétations restent pour le moment hypothétiques et nécessiteront des validations notamment grâce à des études histologiques.

B. Complémentarité de l'imagerie gluCEST et de la SRM

Après application de l'imagerie CEST, on remarque que la baisse de Glu est plus prononcée chez les souris homozygotes que chez les hétérozygotes dans le striatum, ce qui est cohérent avec la sévérité du génotype. Les différences observées entre les mesures par SRM et par imagerie gluCEST sont probablement liées à l'effet du volume partiel. En effet, la SRM est effectuée dans un voxel rectangulaire relativement large comprenant la structure d'intérêt ainsi qu'une portion des structures environnantes : il est donc nécessaire de définir un voxel d'étude le plus ajusté possible pour limiter la contribution des autres structures au signal RMN. Par ailleurs, contrairement à l'imagerie CEST qui

permet d'obtenir la distribution du glutamate dans l'ensemble de la ou des coupes imagées, la SRM nécessite de placer un voxel dans une structure déterminée à l'avance. Il y a donc un a priori très fort sur le positionnement du voxel. Dans le cas de modèles ou de maladies affectant de façon sélective une structure particulière, cela n'est pas problématique. Mais lorsque l'on souhaite étudier les altérations à différents endroits du cerveau sans a priori, la SRM peut vite se révéler être limitante. De plus, dans le cas de structures très fines ou hétérogènes comme le corps calleux, le positionnement d'un voxel de spectroscopie peut s'avérer particulièrement compliqué (**Figure VII.19**). L'approche de l'imagerie CSI (pour *Chemical Shift Imaging*) est une alternative mais la sensibilité reste bien inférieure à l'imagerie CEST.

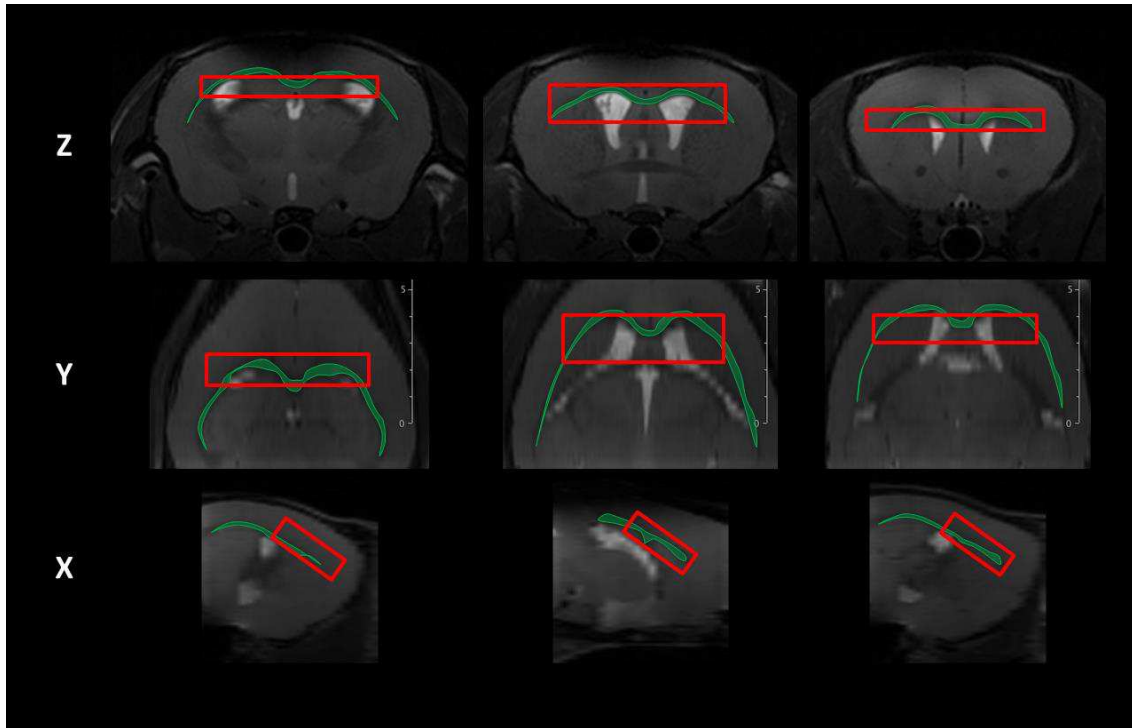


Figure VII.19 : Positionnement d'un voxel pour l'acquisition du profil métabolique du corps calleux.

L'effet de volume partiel est très prononcé pour cette mesure : on estime la proportion de corps calleux dans le voxel inférieure à 15 %

Ainsi, l'utilisation de l'imagerie gluCEST permet d'apporter une très bonne résolution spatiale à des mesures métaboliques minimisant ainsi la contamination des autres structures. Cet avantage facilite les études effectuées sans connaissance préliminaires des structures atteintes par la pathologie et permet d'identifier les régions cérébrales les plus touchées comme le corps calleux pour les souris KI140 (Pépin et al., 2016).

D'un autre côté, il arrive que la concentration de Glu soit préservée malgré des signes de souffrance neuronale comme pour les R6/1. Dans ce cas, aucune altération ne peut être détectée par imagerie gluCEST seule.

En conclusion, l'utilisation combinée de la SRM et de l'imagerie gluCEST permet d'apporter des informations sur différents aspects de la pathologie. La SRM ne s'applique qu'à une structure spécifique et est limitée par sa faible résolution spatiale (effet de volume partiel) mais fournit des renseignements sur les différents types de cellules présentes dans le cerveau. L'imagerie gluCEST quant à elle apporte l'avantage d'une excellente résolution spatiale permettant d'identifier et d'analyser les structures cérébrales les plus atteintes mais peut être aveugle à toute altération n'impliquant aucune variation de la concentration de Glu. L'utilisation d'un protocole combinant ces deux modalités est donc tout à fait adaptée à l'étude de modèles de maladies neurodégénératives.

Ces travaux ont donné lieu à une publication dans la revue scientifique NeuroImage dont l'article se trouve en annexe de ce manuscrit ainsi qu'à des communications scientifiques à la conférence internationale ISMRM de 2016 à Singapour et de 2017 à Hawaï.

Chapitre VIII : Etude du remodelage du métabolisme cérébral dans la maladie de Huntington

Dans le chapitre précédent, nous avons illustré que la grande diversité des modèles animaux permettait d'étudier un mécanisme ou un processus particulier de la maladie. Ces modèles sont des outils absolument cruciaux pour toutes les études visant à comprendre les mécanismes fondamentaux des maladies ou pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements. Si l'étude d'un processus particulier de la maladie permet de se focaliser sur un point précis, cela constitue également un inconvénient majeur car les modèles animaux reproduisent assez difficilement tous les événements liés à la pathologie et à son évolution dans sa globalité. L'illustration avec les deux modèles souris en est le parfait exemple. En effet, le modèle mimant la forme juvénile de la maladie (i.e les R6/1) présente des atteintes du compartiment neuronal, comme le suggèrent les variations fortes du tNAA et l'atrophie du striatum, mais la stabilité des concentrations des autres métabolites laisse penser que le métabolisme général, et le métabolisme énergétique en particulier n'est pas affecté. En revanche, avec le modèle plus progressif (KI140) reproduisant plus fidèlement la pathologie humaine, les atteintes neuronales sont associées à d'autres perturbations affectant le compartiment astrocytaire et ce de façons différentes en fonction des régions du cerveau. Dans ce modèle, les mécanismes de régulation du métabolisme énergétiques sont probablement altérés, ou du moins remodelés en profondeur.

Bien que très informative, cette étude nous a permis de caractériser les souris uniquement à un moment donné de leur vie. Cependant, cette « photographie » à un instant t des modèles souris ne reflète pas du tout l'aspect dynamique de la maladie et ne permet pas de conclure quant à la cinétique d'apparition des différents événements observés ou leur stabilité lorsque l'animal vieillit. Or, il est aisé de penser que l'évolution d'une pathologie n'est pas linéaire dans le temps et que de nombreux mécanismes entrent tour à tour en jeu pour aboutir à l'installation de la maladie. En effet, il a été montré que les manifestations sévères et tardives de la maladie chez les patients Huntington étaient souvent précédées d'événements plus précoces tels que des modifications du métabolisme énergétique (Zabel et al., 2009) ou des altérations de la masse corporelle des patients asymptomatiques (Mochel et al., 2007). Cela suggère que l'installation de la maladie est consécutive à des réorganisations profondes des différents mécanismes de régulation énergétique et métabolique.

Durant cette thèse, nous avons pu utiliser une colonie de rats BACHD établie à MIRCen issue du laboratoire à l'origine de ce modèle (Yu-Taeger et al., 2012). La caractéristique principale de ce modèle est la très lente progression de la maladie avec un phénotype très peu marqué chez les rats BACHD par rapport aux animaux contrôles (voir chapitre VI partie III.B pour plus de détails concernant le modèle).

Ce modèle a donc été utilisé pour examiner chez l'animal les événements qui pourraient potentiellement se développer durant la phase asymptomatique de la maladie chez des porteurs de la mutation.

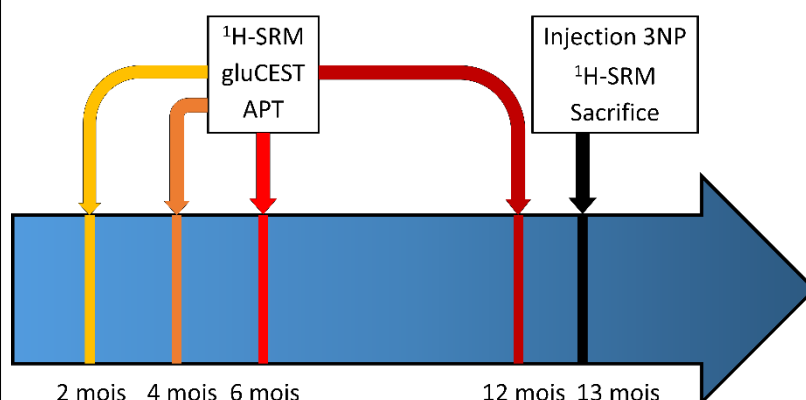
I. Protocole expérimental

Dans le but de déceler les modifications du métabolisme énergétique et les mécanismes de compensation qui se mettent en place dans le modèle BACHD, nous avons choisi d'effectuer un suivi longitudinal comparatif entre des rats sauvages et des rats BACHD. Nous avons donc scanné 6 rats sauvages et 7 rats BACHD à l'âge de 2, 4, 6 et 12 mois en appliquant un protocole, décrit ci-dessous, mêlant spectroscopie du proton et imagerie CEST. Nous avons appliqué un protocole similaire à celui des souris comprenant SRM du proton et imagerie gluCEST auquel nous avons ajouté une acquisition d'imagerie APT afin d'obtenir des informations sur les variations potentielles de pH *in vivo*. Puis, après 12 mois, les rats ont été injectés avec une toxine (3NP) dans le striatum afin de générer un stress métabolique et d'observer les réactions de l'organisme aux effets de la toxine. Le suivi de ces réactions a été effectué par SRM durant les 3h suivant l'injection et l'animal a ensuite été sacrifié afin de récupérer son cerveau.

Figure VIII.1 : Description des différents protocoles appliqués aux rats BACHD.

Le suivi longitudinal utilise la SRM du proton, l'imagerie gluCEST et l'imagerie APT.

Un second protocole de suivi par SRM après injection de la toxine 3NP qui se termine par le sacrifice de l'animal.



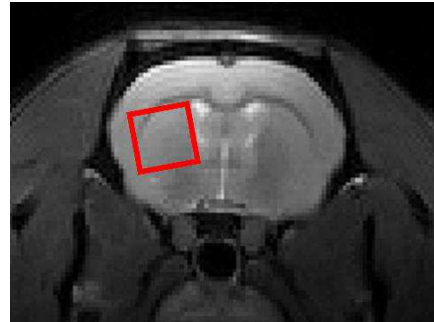
A. Mesure du profil métabolique du striatum

Comme pour le protocole d'imagerie souris, une série d'images anatomiques a été acquise pour positionner précisément le voxel autour du striatum gauche (**Figure VIII.2**). Les mêmes paramètres de la séquence LASER ont ensuite été utilisés (cf chapitre VI partie I.B) pour mesurer le profil métabolique par SRM dans le striatum du rat à l'exception de la taille du voxel dont le volume est de $3,5 \times 3,5 \times 3,5 \text{ mm}^3$. Les spectres ont cette fois-ci été acquis à l'aide de l'antenne volumique et ont une fois de plus permis de quantifier la concentration des métabolites d'intérêt que sont le glutamate,

la glutamine, la choline, le tNAA, la créatine, le myo-inositol, la taurine et le lactate grâce au logiciel LCModel (avec une borne de Cramer-Rao inférieure à 5%). Le champ B_0 a été homogénéisé au sein du même voxel grâce à la routine Mapshim.

Figure VIII.2 : Positionnement du voxel de spectroscopie ^1H (en rouge) autour du striatum chez le rat.

Taille du voxel : $3,5 \times 3,5 \times 3,5 \text{ mm}^3$.



B. Imagerie CEST

Comme pour les souris (chapitre VII), les acquisitions gluCEST et APT ont nécessité l'acquisition d'un Z-spectrum complet. Afin d'assurer la correction et la cartographie des inhomogénéités de B_0 dans le cerveau (**Figure VIII.3**), un Z-spectrum WASSR a également été acquis en appliquant un B_1 de faible intensité ($0,2 \mu\text{T}$) sur une gamme de fréquence allant de $-0,5$ à $0,5 \text{ ppm}$ avec un pas de $0,05 \text{ ppm}$.

Les images comportent trois coupes positionnées de manière à contenir le striatum avec une résolution de $150 \times 150 \times 600 \mu\text{m}^3$. L'homogénéisation du champ B_0 a été effectuée dans un voxel placé autour du cerveau et contenant les 3 coupes (**figure VIII.4**) à l'aide de la routine Mapshim permettant de faire un shim localisé. L'utilisation de l'antenne volumique permet d'obtenir un B_1 homogène et ainsi de s'affranchir de la correction d'un éventuel biais en post-traitement.

Les paramètres de saturation pour chacune des modalités sont les suivants :

- **gluCEST :**
21 images acquises sur une gamme de fréquence s'étendant de -5 à 5 ppm (avec un pas de $0,5 \text{ ppm}$) en appliquant un B_1 de $5 \mu\text{T}$ et un t_{sat} de 1 s .
La quantification du signal gluCEST se fait en calculant le rapport de transfert d'aimantation asymétrique (MTRasym) comme présenté lors du protocole souris (chapitre VII).
- **APT :**
35 images acquises entre -8 et 8 ppm avec un B_1 de $1 \mu\text{T}$ et un t_{sat} de 1 s . L'acquisition des 35 images ne se fait pas avec un pas fréquentiel régulier : pour faciliter la caractérisation des effets APT et NOE (apparaissant à $3,5 \text{ ppm}$ et $-3,5 \text{ ppm}$ respectivement), nous avons décidé d'augmenter l'échantillonnage du Z-spectrum au niveau des fréquences de résonance de ces effets. Ainsi, l'acquisition APT se fera avec un pas de 1 ppm sur les intervalles $[-8 ; -5] \text{ ppm}$ et $[8 ; 5] \text{ ppm}$, de $0,5 \text{ ppm}$ aux fréquences proches de l'eau libre ($[-2 ; 2] \text{ ppm}$) et enfin de $0,25$ au niveau des bornes des effets APT et NOE soit $[2,5 ; 4,5] \text{ ppm}$ et $[-4,5 ; -2,5] \text{ ppm}$.
Pour quantifier les signaux APT et NOE, nous calculerons l'effet CEST apparent tel qu'il a été décrit dans le chapitre V de manière à obtenir une cartographie de l'effet APT* et NOE*.

II. Résultats

A. Suivi longitudinal du profil métabolique par SRM

Un exemple de spectre ^1H acquis dans le striatum gauche d'un animal de chaque groupe est présenté sur la **figure VIII.5**. Les données présentées ici correspondent au spectre brut sans filtrage. Le SNR est largement suffisant pour mesurer avec précision ($\text{CRLB} < 5\%$) les métabolites d'intérêts. Néanmoins, on constate que le SNR est très inférieur à celui obtenu dans un voxel bien plus petit chez la souris avec la même séquence et le même temps d'acquisition. Ceci est uniquement dû à la sensibilité de l'antenne qui est dans le cas des études rat une antenne à température ambiante et non une antenne cryogénique comme pour les études souris.

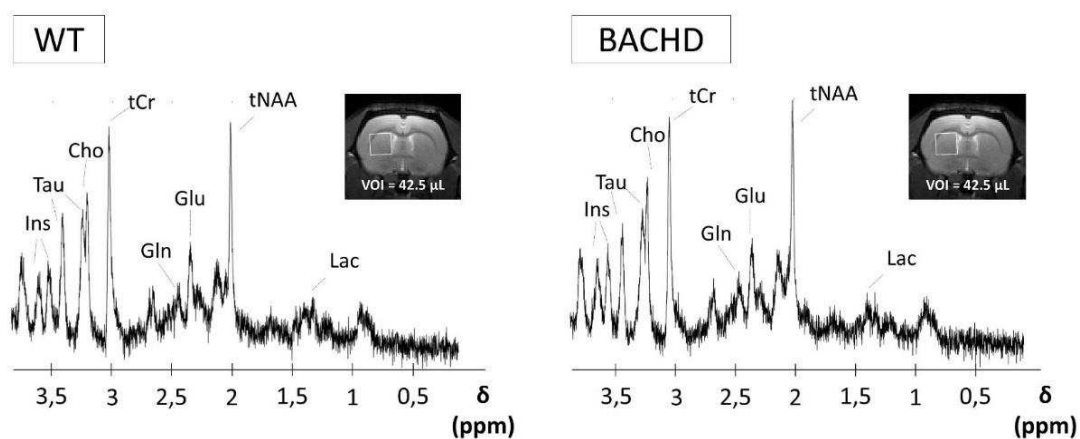


Figure VIII.4 : Positionnement du voxel de spectroscopie ^1H (en rouge) autour du striatum chez le rat.

Taille du voxel : $3,5 \times 3,5 \times 3,5 \text{ mm}^3$.

Grâce au suivi longitudinal de la même cohorte d'animaux, nous avons pu mesurer le profil métabolique des animaux durant 1 an. Les résultats pour chaque métabolite sont présentés sur la **figure VIII.5**. Les données représentent la concentration moyenne de chaque métabolite au sein de chaque cohorte (composées respectivement de 6 rats sauvages et 7 rats BACHD) et les barres d'erreurs représentent l'écart-type. Les concentrations mesurées ici sont normalisées par rapport au signal de la créatine. Cette procédure est couramment employée car la concentration de ce métabolite est considérée comme étant la plus stable dans le cerveau (Li et al., 2003).

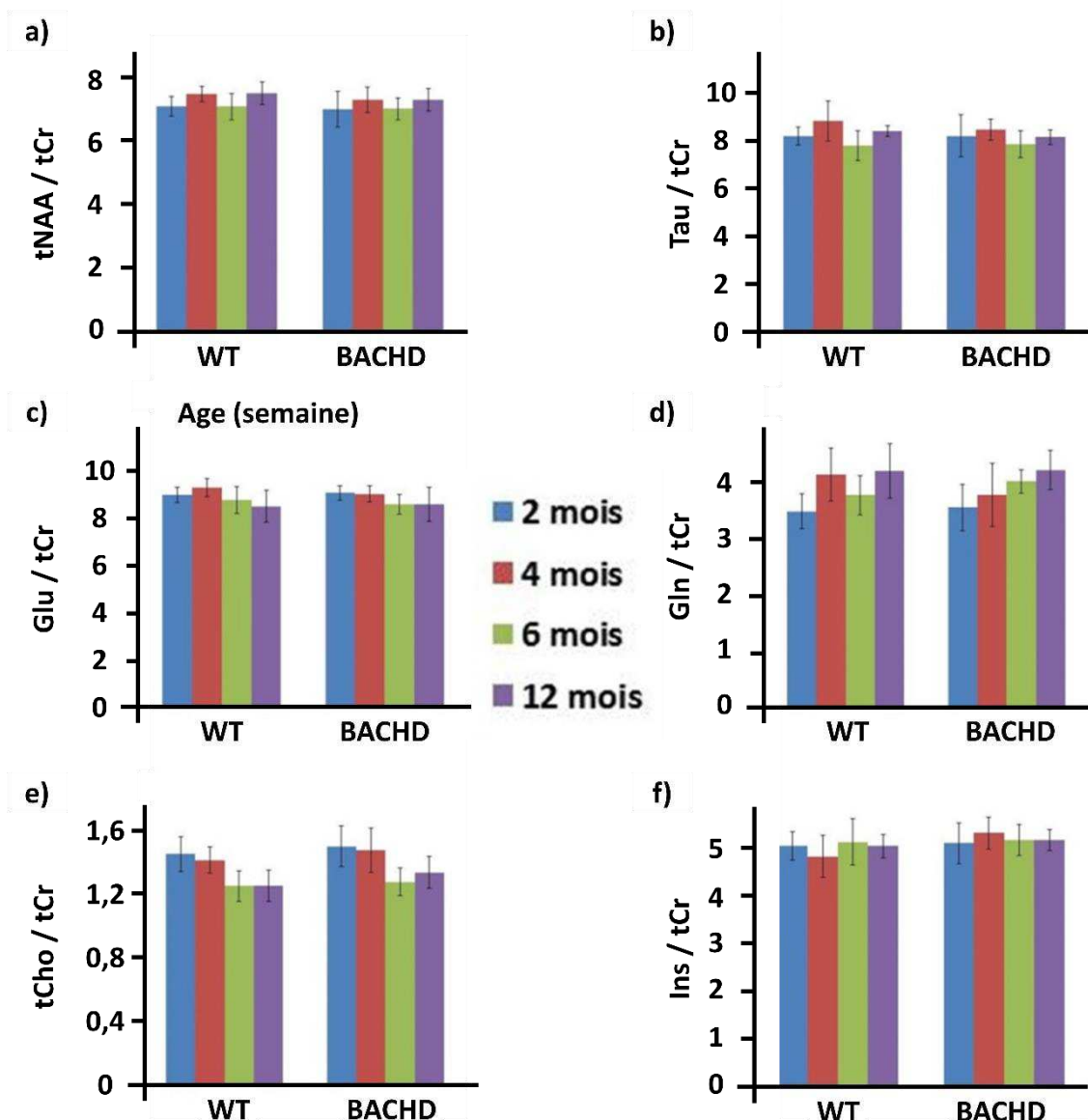


Figure VIII.5 : Evolution des concentrations de métabolites dans le striatum de rats sauvages et BACHD entre 2 et 12 mois.

Les concentrations de tNAA, Tau, Glu, Gln, tCho et Ins sont normalisées par la tCr. Aucune variation significative n'est observée que ce soit au cours du temps ou selon le génotype

Toutefois, afin de s'assurer que la normalisation n'introduisait pas un biais majeur, nous avons vérifié les profils métaboliques en normalisant les données par le signal mesuré sur un spectre de l'eau systématique acquis avant chaque spectre. Hormis une variabilité plus importante, les résultats moyens obtenus étaient très comparables avec ceux obtenus par normalisation par la créatine. Par ailleurs, la concentration de la créatine était similaire entre les animaux BACHD et les animaux contrôles. Cela suggère qu'il n'y a pas de variation majeure de la créatine qui pourrait fausser l'interprétation des données telles qu'elles sont présentées ici.

1. Stabilité des profils métaboliques

On constate que la concentration de chacun des métabolites reste relativement stable au cours du temps et ce pour chaque génotype. De même, il n'a pas été mesuré de différence de concentration entre les deux génotypes. La stabilité est particulièrement remarquable pour le tNAA, la Tau et l'Ins qui ne présentent même pas une tendance. La tCho semble montrer une tendance à la baisse au cours du temps pour les deux cohortes. De même, il semblerait que la Gln augmente très légèrement au cours du temps dans les deux cohortes. Cependant, ces variations ne sont pas statistiquement significatives.

2. Cas particulier du Lactate

Le seul métabolite présentant des variations significatives est le lactate. Un test de normalité des données a été réalisé à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk afin de s'assurer de la possibilité d'effectuer une ANOVA à mesures répétées.

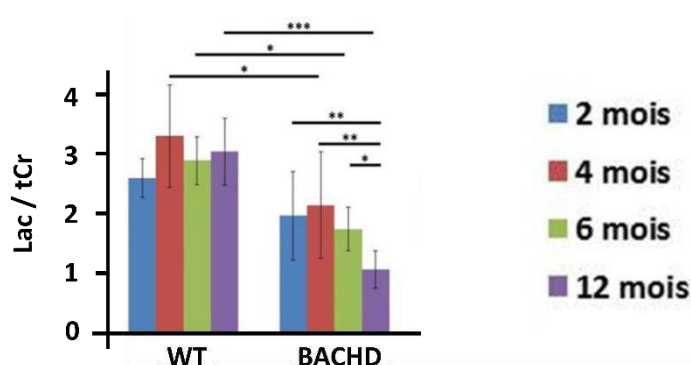


Figure VIII.6 : Evolution de la concentration de Lactate dans le striatum de rats sauvages et BACHD entre 2 et 12 mois.

La diminution du Lactate est significative chez les BACHD à partir de 4 mois comparés aux rats contrôles. De plus, la baisse mesurée chez les BACHD devient de plus en plus importante et est même significative à 12 mois comparée aux précédents points de mesure.

ANOVA à mesures répétées avec un seuil de significativité fixée à $p < 0.05$). Le test post-hoc utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes était un LSD de Fisher (pour *least significant difference*). Les seuils de significativité utilisés sont les suivants : *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

On constate tout d'abord d'après la **figure VIII.6** que les concentrations de lactate à chaque temps de mesure sont différentes entre les deux groupes de rats. En effet, nous avons mesurés des variations de -24,4 % à 2 mois (toutefois non-significative), -17,5 % à 4 mois, -33,0 % à 6 mois et enfin -59,2 % à 12 mois.

En plus d'une baisse globale de lactate observée entre le groupe de rats sauvages et le groupe BACHD, nous avons observé une diminution significative de la concentration en lactate pour les animaux BACHD au cours du temps. Si les variations mesurées entre 2, 4 et 6 mois ne sont pas significatives, la baisse constatée à 12 mois l'est et ce par rapport à chacune des autres mesures réalisées aux temps plus précoces. Dans le groupe contrôle en revanche, aucune différence significative de concentration de lactate n'a été observée au cours du temps.

B. Suivi longitudinal de la distribution de glutamate par IRM-CEST

L'application de l'imagerie gluCEST permet d'obtenir des informations primordiales concernant le métabolisme neuronal. La mesure des variations du contraste gluCEST au cours du temps offre donc la possibilité d'observer les changements du métabolisme énergétique dans le cerveau et notamment des interactions entre neurones et astrocytes. La très bonne résolution spatiale de l'imagerie CEST comparée à la SRM permet également de mettre en évidence les structures dans lesquelles ces changements apparaissent.

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas un biais systématique dans nos images gluCEST (dû potentiellement à l'homogénéité des antennes, à la position de l'animal dans l'aimant ou à tout autre artéfact non anticipé), nous avons choisi de segmenter les structures dans chacun des hémisphères du cerveau. De ce fait, nous avons au total 9 régions d'intérêt (ROIs) correspondant à :

- Striatum gauche / droit
- Corps calleux gauche / droit
- Cortex gauche / droit
- Tronc cérébral et pallidum gauche / droit
- Septum

Etant donné que le septum est une structure centrale et relativement petite, nous avons préféré ne délimiter qu'une seule ROI afin de conserver un nombre suffisant de pixels dans cette région.

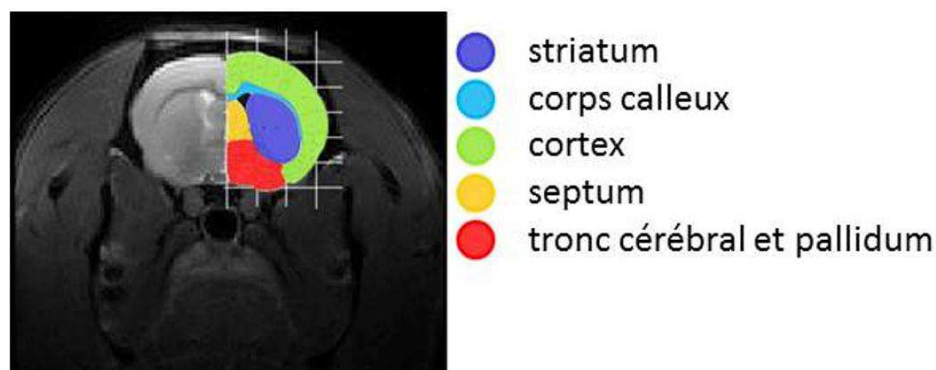


Figure VIII.7 : Segmentation des différentes régions d'intérêt choisies pour évaluer l'effet CEST.

Le cerveau a été découpé en cinq ROIs : le striatum, le corps calleux, le cortex, le septum et enfin une région regroupant le tronc cérébral et le pallidum.

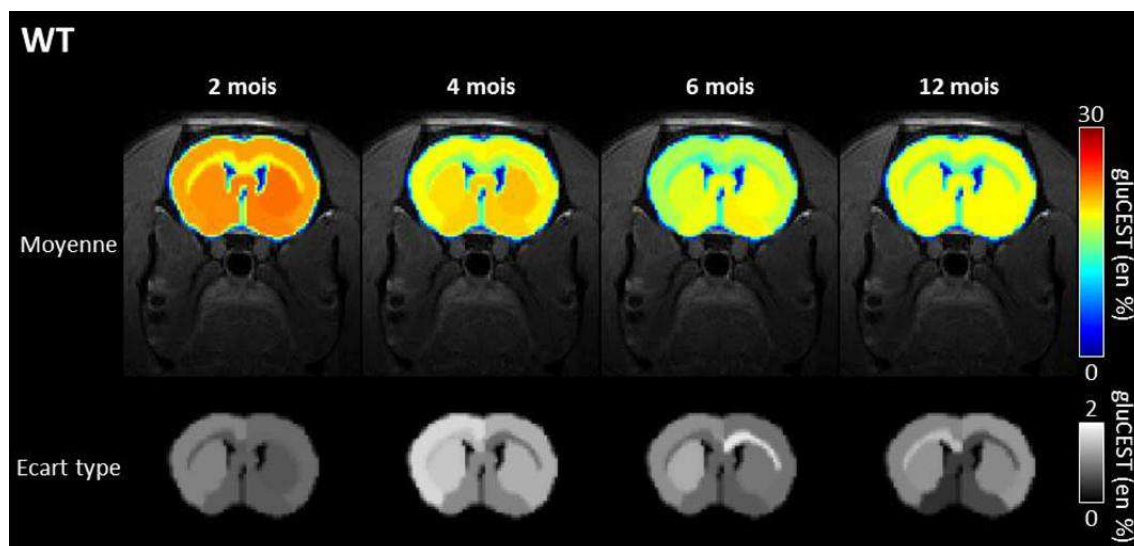


Figure VIII.8 : Evolution du contraste gluCEST dans le cerveau de rats sauvages entre 2 et 12 mois.

On remarque que le niveau de Glu semble globalement plus élevé chez les jeunes rats (2 mois) que lors des mois suivants. Le contraste semble même diminuer à chaque nouveau point de mesure.

Les effets MTRasym mesurés entre 2 et 3 ppm au sein de chaque ROI ont été moyennés sur l'ensemble des animaux de chaque cohorte et ce pour chaque temps de mesure. Ainsi, on peut établir des cartes d'effets gluCEST moyennes pour les rats sauvages (**figure VIII.8**) et les animaux BACHD (**figure VIII.10**) à 2, 4, 6 et 12 mois. Sur ces figures, nous avons également représenté les cartes des écart-types mesurés au sein de chaque ROI (**figure VIII.8**, panel du bas). On constate qu'aussi bien pour les rats sauvages que les BACHD, les écart-types sont systématiquement inférieurs à 2% (mesurée dans le corps calleux droit à 6 mois chez les animaux sauvages). En moyenne, les écart-types constatés sont plutôt de l'ordre de 1 à 1.5%, ce qui correspond à la variabilité interindividuelle au sein de chaque groupe (n = 6 pour les animaux sauvages et n = 7 pour les BACHD).

1. Variation des cartes gluCEST des rats sauvages au cours du temps

Pour les rats sauvages, on constate que le niveau de glutamate semble baisser au cours du temps. L'effet gluCEST est de l'ordre de 22% en moyenne dans le striatum à 2 mois et diminue de 16% à 12 mois. Des diminutions comparables sont également mesurées dans l'ensemble des structures du cerveau. Afin de mieux visualiser les variations du glutamate au cours du temps, nous avons pris le parti de prendre la carte gluCEST mesurée à 2 mois comme carte de référence. Ainsi, les cartes de variation ont été calculées pour chaque point de mesure à 4, 6 et 12 mois suivant la formule définie par l'équation (VII.1) :

$$Variation = 100 \cdot \frac{MTR_{asym}(2 \text{ mois}) - MTR_{asym}(\text{autre \u00e2ge})}{MTR_{asym}(2 \text{ mois})} \quad (\text{VII.1})$$

Les cartes de variations des effets gluCEST pour les rats sauvages sont pr\u00e9sent\u00e9es **figure VIII.9**.

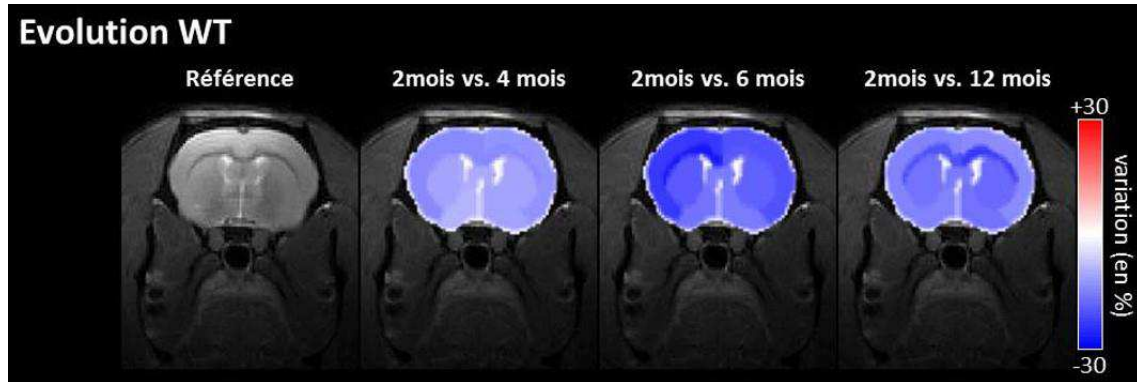


Figure VIII.9 : Evolution des variations du contraste gluCEST dans le cerveau de rats sauvages compar\u00e9e au signal gluCEST mesur\u00e9 \u00e0 2 mois.

On observe une diminution du contraste gluCEST apr\u00e8s 2 mois qui est plus prononc\u00e9e \u00e0 partir de 6 mois.

On constate d'apr\u00e8s la **figure VIII.9** que d\u00e8s 4 mois, le niveau de glutamate baisse d'environ 10% dans l'ensemble du cerveau, et en particulier dans le cortex et le corps calleux. Cette baisse se poursuit jusqu'\u00e0 6 mois puis semble stagner entre 6 et 12 mois. Il semblerait n\u00e9anmoins que le corps calleux soit la structure pr\u00e9sentant la diminution des effets gluCEST la plus prononc\u00e9e avec une baisse d'environ 20% \u00e0 12 mois.

Par ailleurs, hormis pour le cortex gauche et le corps calleux gauche \u00e0 6 mois, les variations d'effets CEST sont toujours du m\u00eame ordre dans les h\u00e9misph\u00e8res gauche et droit. Cela confirme la reproductibilit\u00e9 de nos mesures et l'absence de biais syst\u00e9matique dans les cartes gluCEST.

Afin de simplifier la lecture des images, nous n'avons pas repr\u00e9sent\u00e9s les structures pr\u00e9sentant des variations significatives. N\u00e9anmoins, toutes les variations des effets CEST par rapport aux effets mesur\u00e9s \u00e0 2 mois sont significatives. Le **tableau VIII.1** r\u00e9sume les diff\u00e9rentes variations ainsi que les p-values correspondantes.

WT Evolution par rapport à 2 mois	4 mois		6 mois		12 mois	
	Variation gluCEST (en %)	p-value	Variation gluCEST (en %)	p-value	Variation gluCEST (en %)	p-value
Striatum gauche	-10,3	$1,3 \times 10^{-2}$	-19,3	$1,0 \times 10^{-4}$	-16,5	$1,9 \times 10^{-4}$
Striatum droit	-10,7	$3,0 \times 10^{-2}$	-18,2	$4,7 \times 10^{-6}$	-17,7	$1,5 \times 10^{-5}$
Corps calleux gauche	-13,2	$4,6 \times 10^{-3}$	-26,8	$6,1 \times 10^{-7}$	-20,6	$2,3 \times 10^{-4}$
Corps calleux droit	-13,7	$3,2 \times 10^{-4}$	-19,3	$1,4 \times 10^{-3}$	-23,1	$1,1 \times 10^{-6}$
Cortex gauche	-13,4	$5,2 \times 10^{-3}$	-22,8	$1,4 \times 10^{-5}$	-14,6	$3,9 \times 10^{-4}$
Cortex droit	-12,9	$1,7 \times 10^{-3}$	-20,6	$4,1 \times 10^{-6}$	-13,1	$6,5 \times 10^{-4}$
Septum	-8,6	$1,9 \times 10^{-3}$	-14,7	$8,4 \times 10^{-6}$	-14,4	$9,3 \times 10^{-7}$
Tronc cérébral et pallidum gauche	-9,0	$4,1 \times 10^{-3}$	-16,1	$1,5 \times 10^{-5}$	-14,7	$3,0 \times 10^{-6}$
Tronc cérébral et pallidum droit	-10,6	$8,2 \times 10^{-4}$	-15,6	$9,0 \times 10^{-6}$	-16,5	$1,7 \times 10^{-6}$

Tableau VIII.1 : Tableau récapitulatifs des variations de contraste gluCEST mesurées à 4, 8 et 12 mois comparées au signal à 2 mois chez les rats sauvages.

p-values significatives à partir de 0,05 : *, $p < 0,05$ - **, $p < 0,01$ - ***, $p < 0,001$.

2. Variation des cartes dluCEST des rats BACHD au cours du temps

Le même traitement des données gluCEST a été réalisé pour la cohorte de rats BACHD. Les cartes gluCEST ainsi que les cartes de variation par rapport à la carte mesurée à 2 mois sont présentées **figure VIII.10** et **VIII.11** respectivement.

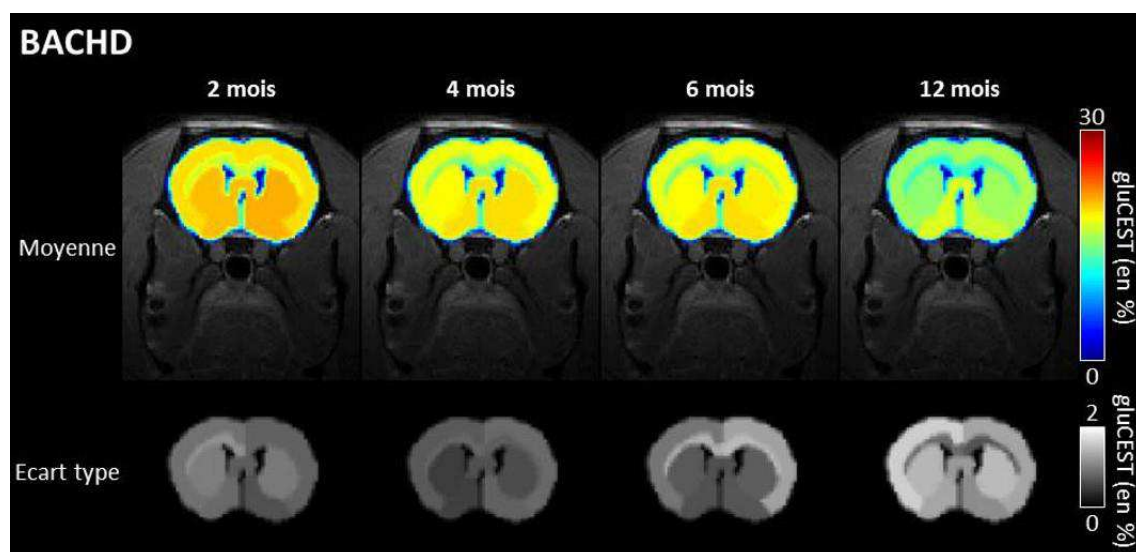


Figure VIII.10 : Evolution du contraste gluCEST dans le cerveau de rats BACHD entre 2 et 12 mois.

On remarque que le niveau de Glu semble globalement plus élevé chez les jeunes rats (2 mois) et qu'il diminue à chaque nouveau point de mesure.

Il est intéressant de noter que le niveau basal d'effet gluCEST à 2 mois est plus faible chez les animaux BACHD par rapport aux animaux contrôles. De même que pour les rats sauvages, on constate que le niveau gluCEST baisse au cours du temps chez les BACHD dans l'ensemble des structures du cerveau. Cependant, cette variation semble évoluer différemment au cours du temps. La **figure VIII.11** permet de mieux se rendre compte de l'évolution différenciée des effets gluCEST chez les rats BACHD.

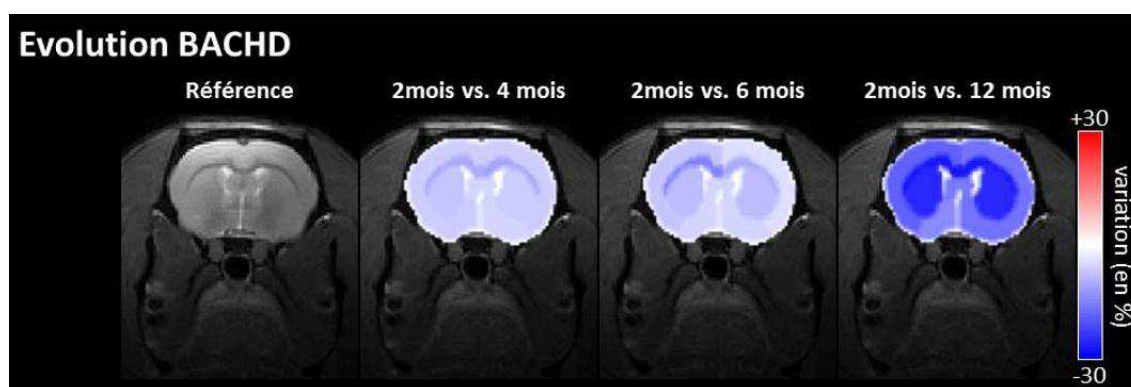


Figure VIII.11 : Evolution du contraste gluCEST dans le cerveau de rats BACHD entre 2 et 12 mois.

On remarque que le niveau de Glu semble globalement plus élevé chez les jeunes rats (2 mois) et qu'il diminue à chaque nouveau point de mesure.

Contrairement aux rats sauvages, la baisse des effets gluCEST est moins prononcée pour les âges avant 1 an car elle est de l'ordre de 6 à 8% pour la majorité des structures du cerveau à 4 et 6 mois, excepté dans le corps calleux où des variations de 10 à 14% sont mesurées. Il est intéressant de noter que contrairement aux rats sauvages, les cartes de variations à 4 mois et 6 mois sont relativement comparables, suggérant une stabilisation des niveaux de glutamate durant les 6 premiers mois. En revanche, à 12 mois, il semblerait que le niveau de glutamate soit fortement affecté, en particulier dans le striatum et dans le corps calleux des animaux BACHD. Le tableau **VIII.2** résume les différentes variations ainsi que les niveaux de significativité correspondants mesurées pour chaque point de mesure.

BACHD Evolution par rapport à 2 mois	4 mois		6 mois		12 mois	
	Variation gluCEST (en %)	p-value	Variation gluCEST (en %)	p-value	Variation gluCEST (en %)	p-value
Striatum gauche	-7,3	$3,8 \times 10^{-3}$	-8,4	$3,0 \times 10^{-3}$	-24,6	$5,9 \times 10^{-6}$
Striatum droit	-6,3	$8,9 \times 10^{-3}$	-8,0	$3,0 \times 10^{-3}$	-24,8	$4,5 \times 10^{-6}$
Corps calleux gauche	-10,1	$7,5 \times 10^{-3}$	-14,5	$3,8 \times 10^{-3}$	-27,2	$6,6 \times 10^{-6}$
Corps calleux droit	-10,5	$7,2 \times 10^{-4}$	-9,8	$1,9 \times 10^{-2}$	-25,6	$2,2 \times 10^{-7}$
Cortex gauche	-5,8	$2,4 \times 10^{-2}$	-6,7	$2,1 \times 10^{-2}$	-18,7	$2,4 \times 10^{-4}$
Cortex droit	-5,7	$2,1 \times 10^{-2}$	-4,5	$1,1 \times 10^{-1}$	-16,8	$9,0 \times 10^{-5}$
Septum	-4,9	$8,1 \times 10^{-3}$	-4,6	$9,0 \times 10^{-3}$	-14,7	$5,2 \times 10^{-5}$
Tronc cérébral et pallidum gauche	-5,7	$8,6 \times 10^{-3}$	-5,3	$1,9 \times 10^{-2}$	-14,0	$3,6 \times 10^{-4}$
Tronc cérébral et pallidum droit	-5,2	$6,7 \times 10^{-3}$	-5,2	$9,0 \times 10^{-3}$	-16,5	$1,2 \times 10^{-5}$

Tableau VIII.2 : Tableau récapitulatifs des variations de contraste gluCEST mesurées à 4, 8 et 12 mois comparées au signal à 2 mois chez les rats BACHD.

p-values significatives à partir de 0,05 : *, $p < 0,05$ - **, $p < 0,01$ - ***, $p < 0,001$.

3. Comparaison des variations de gluCEST entre les deux groupes

Afin d'aller plus loin dans l'analyse de ces données, nous avons choisi de comparer les niveaux de glutamate mesurés à 2, 4, 6 et 12 mois entre les deux groupes de rats. Pour faciliter les comparaisons, nous avons moyennés les valeurs obtenues dans chaque hémisphère pour chacune des structures. Les décours temporels des effets gluCEST pour les 5 structures considérées sont présentés **figure VIII.12**.

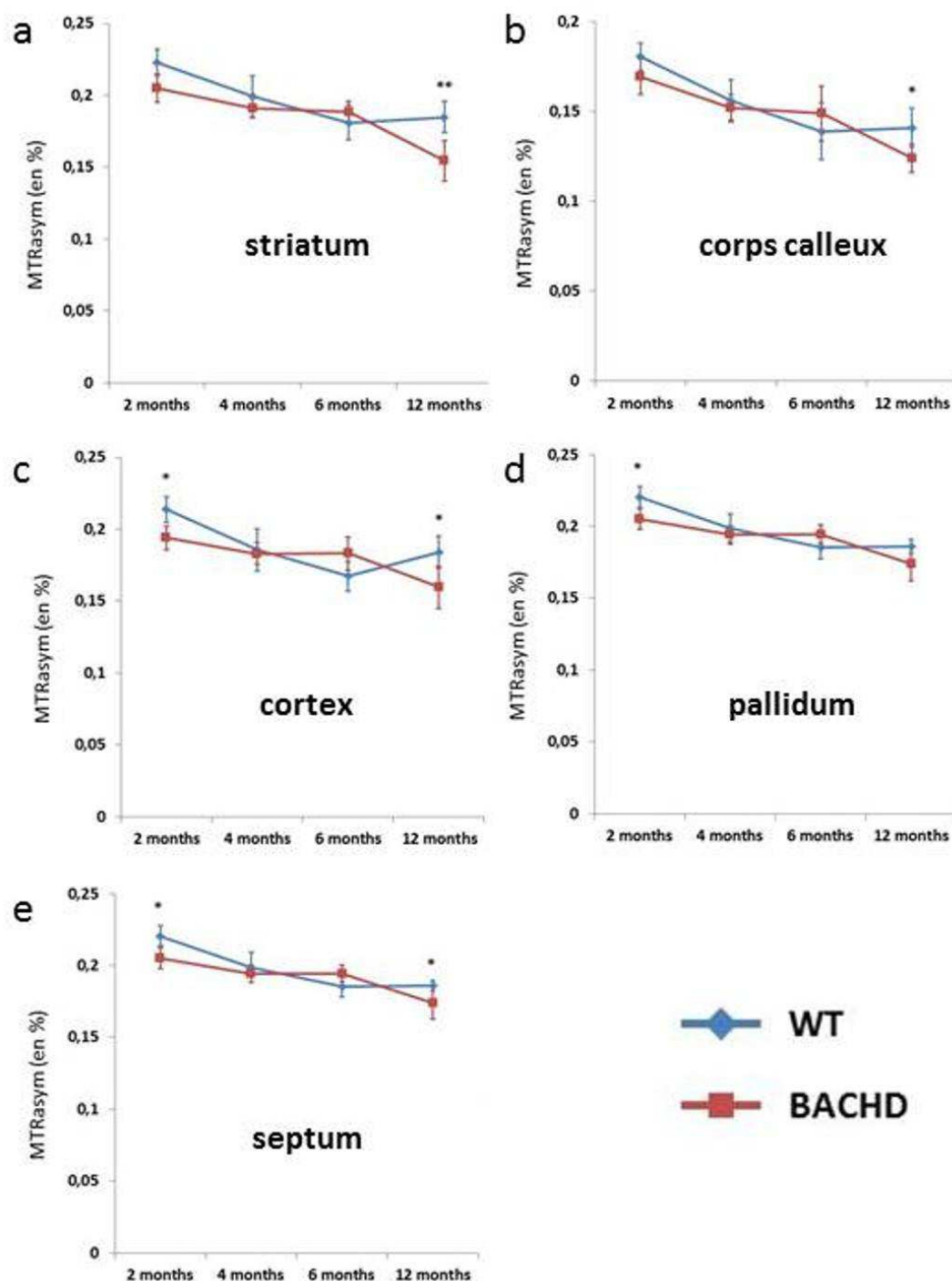


Figure VIII.12 : Tableau récapitulatifs des variations de contraste gluCEST mesurées à 4, 8 et 12 mois comparées au signal à 2 mois chez les rats BACHD.

La significativité statistique des variations a été établie à l'aide d'une analyse factorielle (ANOVA à mesures répétées avec un seuil de significativité fixé à 0.05). Le test post-hoc utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes était un LSD de Fisher (pour least significant difference). Les seuils de significativité utilisés sont les suivants : *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Un test de normalité a également été réalisé à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk afin de s'assurer de la possibilité d'effectuer une analyse factorielle à mesures répétées.

Globalement, on retrouve les mêmes conclusions que celles établies suite à l'observation des cartes gluCEST pour chaque cohorte d'animaux. On observe une baisse généralisée des effets CEST pour l'ensemble des structures et pour les deux cohortes. Néanmoins, il est clair ici que les décours temporels des effets CEST est relativement différents pour les rats sauvages et les BACHD. En effet, les effets CEST semblent baisser sur les 6 premiers mois chez les rats sauvages avant de se stabiliser. Au contraire, chez les BACHD, la baisse est beaucoup plus lente pendant les premiers mois mais s'accroît à 12 mois.

Afin d'aider la représentation visuelle de ces données, nous avons calculé les cartes de variation des effets CEST entre les animaux sauvages et les BACHD pour chaque temps de mesure. Ces cartes de variations sont présentées sur la **figure VIII.13**.

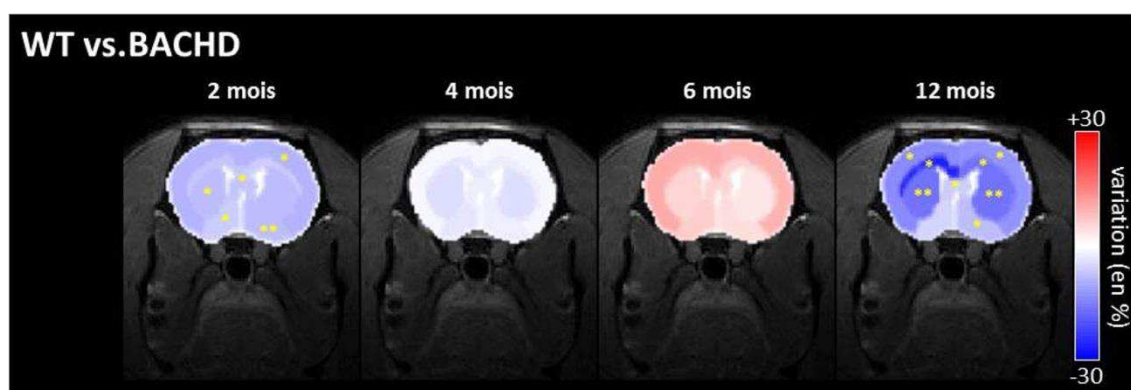


Figure VIII.13 : Cartes de variations du signal gluCEST des rats BACHD comparés aux rats contrôles.

Globalement, le contraste gluCEST est plus faible chez les BACHD que chez les rats contrôle. On remarque cependant qu'à 6 mois, la carte de variations est essentiellement positive. A 12 mois, les diminutions de Glu dans le cerveau sont significatives.

A 2 mois, on constate comme suggéré précédemment, que les niveaux de glutamate moyens sont plus faibles chez les animaux BACHD que chez les animaux sauvages. Certaines variations sont d'ailleurs statistiquement significatives, notamment dans le cortex droit, le striatum gauche et le pallidum. Néanmoins, les différences d'effets gluCEST restent relativement modestes (-9% au maximum dans le striatum).

A 4 mois, si les niveaux d'effets CEST mesurés chez les rats BACHD sont globalement plus faibles que chez les rats sauvages, les différences mesurées ne sont pas significatives. Les variations maximales observées sont de l'ordre de 4%, ce qui correspond au bruit de mesure comme nous l'avons observé chez les souris (voir **figure VII.13**).

Au premier abord, la carte de variation mesurée à 6 mois paraît surprenante car elle suggère une augmentation des effets CEST chez les BACHD par rapport aux animaux contrôles. En réalité, plutôt qu'une augmentation, cette carte traduit une diminution plus lente des effets CEST dans le cerveau des animaux BACHD. Toutefois, les tests statistiques ne permettent pas d'identifier des structures présentant des effets CEST significativement différents.

Enfin, la carte de variation obtenue à 12 mois est la plus informative. En effet, on constate de fortes baisses des effets gluCEST dans le cortex, le striatum et le corps calleux (de l'ordre de 15%) entre les animaux BACHD et les rats sauvages. Ces variations sont toutes significativement différentes, excepté dans le pallidum gauche.

C. Suivi longitudinal des altérations de pH par IRM-CEST

Les résultats obtenus en imagerie gluCEST montrent très clairement des variations des effets CEST au cours du temps et également entre les deux groupes d'animaux à certains temps de mesure. Comme nous l'avons précisé précédemment dans ce manuscrit, l'imagerie gluCEST repose sur la détection des protons $-NH_2$ du glutamate avec l'eau libre. Or ces protons sont relativement labiles et donc leur taux d'échange est dépendant des conditions physiologiques du milieu. Ainsi, l'effet gluCEST peut à la fois dépendre de la concentration en glutamate mais également du pH. La dépendance au pH a d'ailleurs été étudiée au cours de cette thèse et est présentée sur la **figure V.14** chapitre V.

L'imagerie APT est une technique particulièrement sensible aux modifications du pH tissulaire (Sun et al., 2012). Aussi, afin de déterminer si les variations d'effets CEST mesurées en imagerie gluCEST étaient dues à des modifications de la concentration en glutamate, à la modification du pH tissulaire ou aux deux phénomènes combinés, nous avons appliqué le protocole d'imagerie APT décrit dans le chapitre V.

La **figure VIII.14** présente les Z-spectrum typiques acquis dans la cohorte de rats sauvages (en bleu) et BACHD (en rouge). Ces Z-spectrum ont été acquis dans le striatum droit à 2 mois. On constate que les deux Z-spectrum sont quasiment identiques. Des Z-spectrum similaires ont également été acquis pour l'ensemble des structures et l'ensemble des points de mesure.

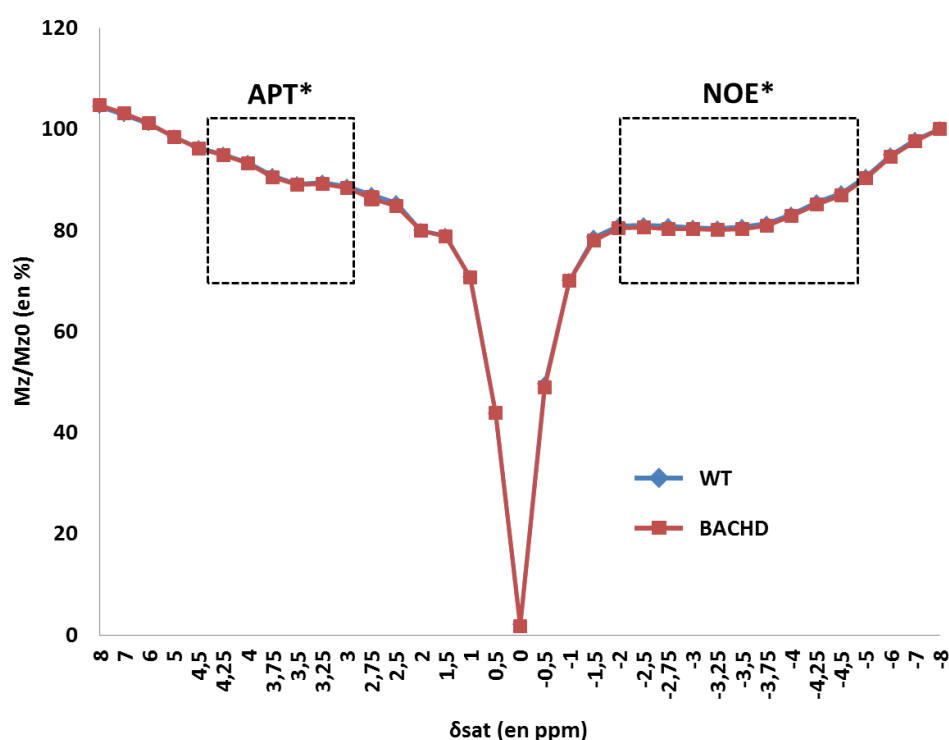


Figure VIII.14 : Z-spectra APT acquis dans le striatum des rats BACHD (rouge) et contrôles (bleu).

Ces Z-spectra ont été acquis suite à l'application d'une saturation de 1 μT pendant 1 s. On observe bien les effets APT et NOE qui peuvent être quantifiés en calculant les effets apparents APT* et NOE*.

L'analyse des Z-spectra pour l'imagerie APT et NOE est souvent complexe car l'approche asymétrique utilisée en imagerie gluCEST peut annuler des effets opposés ayant lieu du côté positif du Z-spectrum (APT - effet à 3,5 ppm) ou du côté négatif (NOE – effet à -3.5 ppm). Pour s'affranchir de cet effet, il a été développé une approche alternative appelée APT* et NOE* (voir chapitre V de ce manuscrit). Les effets APT* et NOE* pour ces Z-spectra sont présentés sur les **figures VIII.15a** et **VIII.15b** respectivement. On constate à nouveau que les effets APT* et NOE* sont identiques pour les deux cohortes d'animaux.

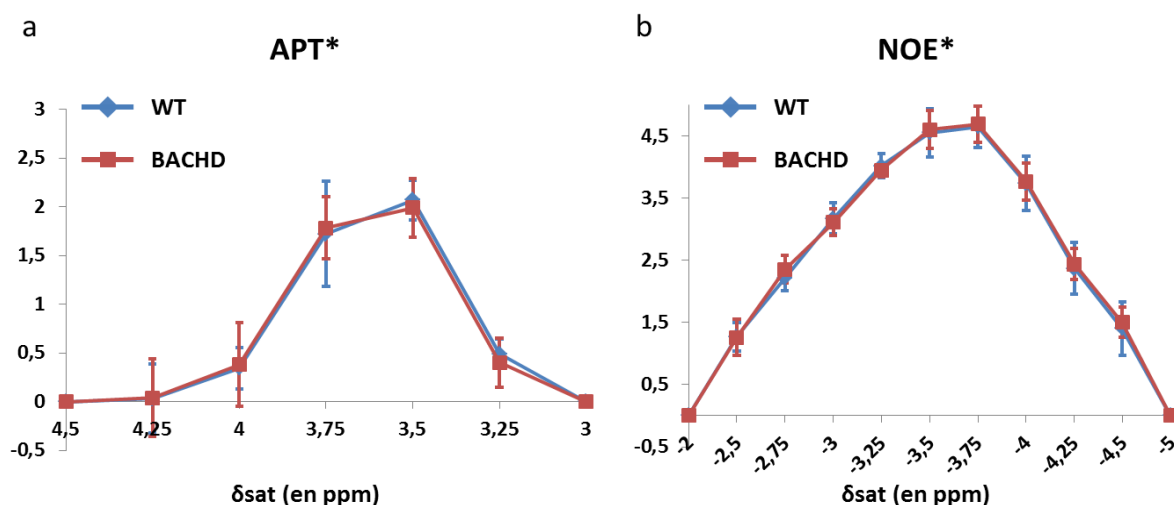


Figure VIII.15 : Cartes de variations du signal gluCEST des rats BACHD comparés aux rats contrôles.

Globalement, le contraste gluCEST est plus faible chez les BACHD que chez les rats contrôle. On remarque cependant qu'à 6 mois, la carte de variations est essentiellement positive. A 12 mois, les diminutions de Glu dans le cerveau sont significatives.

Les résultats des mesures APT ne montrant aucune variation entre les deux génotypes, on en déduit que le pH reste stable dans ce modèle. Nous pouvons donc exclure le pH comme biais potentiel sur les mesures gluCEST.

III. Discussion et interprétation des données

A. Un modèle peu sévère de la maladie de Huntington

Les résultats de SRM nous ont permis de mettre en évidence que les profils métaboliques mesurés dans le striatum des animaux, hormis pour le lactate, étaient relativement stables au cours du temps. Cette stabilité des différentes concentrations de métabolites semble cohérente avec la caractéristique principale du modèle qui est sa très lente progression. En effet, le tNAA qui est considéré comme un très bon marqueur de la densité et de l'intégrité neuronale est stable entre les animaux WT et BACHD et stable au cours du temps. Cela suggère que le compartiment neuronal dans les animaux BACHD n'est pas altéré par l'expression de la protéine HTT mutée. De même, les marqueurs typiquement astrocytaires comme l'Ins et la Gln présentent des concentrations stables au cours du temps et entre les rats sauvages et BACHD. Ces résultats laissent donc penser que les astrocytes ne sont pas particulièrement réactifs dans les animaux BACHD aux âges auxquels les mesures ont été effectuées.

A notre connaissance, les résultats de SRM du proton obtenus durant cette thèse constituent la première étude de ce genre du modèle rat BACHD. De ce fait, il est compliqué de comparer les profils métaboliques obtenus au cours de cette thèse avec des résultats déjà publiés dans la littérature. Néanmoins, il a été montré que les souris BACHD ne présentaient pas d'atrophie du cerveau à l'âge de 6 mois (Gray et al., 2008). Cela semble confirmer l'intégrité des tissus cérébraux, au moins durant les premiers mois de vie des animaux. Malheureusement, nous n'avons pas eu l'opportunité d'acquérir des images anatomiques couvrant l'ensemble du cerveau des animaux. Cela nous aurait permis de mesurer le volume striatal au cours du temps afin de s'assurer que le volume restait identique au cours du temps, confirmant ainsi la stabilité des différentes concentrations des métabolites.

En dépit du plus grand nombre de répétitions du triplet CAG que dans la forme humaine de la maladie (97 chez les BACHD contre 38 et plus pour la forme humaine), ce modèle rat permet très certainement de reproduire des événements qui peuvent potentiellement se développer durant la phase asymptomatique de la maladie chez des porteurs de la mutation. En effet, la protéine humaine mutée exprimée n'étant pas clivée, elle ne se retrouve que très peu dans l'exon 1 ce qui a pour conséquence de rendre le modèle plus progressif. Ce modèle pourra donc à l'avenir s'avérer particulièrement intéressant pour tester de futures thérapies visant les stades précoces de la maladie.

B. Réorganisations métaboliques et régulation du métabolisme énergétique

Les résultats les plus frappants obtenus dans cette étude sont certainement les variations des niveaux de glutamate dans le cerveau des rats BACHD mais également dans le cerveau des rats sauvages en fonction de l'âge des animaux mises en évidence grâce à l'imagerie gluCEST.

1. Stabilité du pH intracellulaire

Comme nous le présentons dans le chapitre V, les taux d'échange des protons amines du glutamate peuvent être fortement influencés par le pH environnant. Les résultats obtenus en imagerie APT et NOE dans des régions d'intérêt identiques à celles utilisées en imagerie gluCEST permettent de s'assurer que le pH ne varie pas au cours du temps et entre les deux cohortes d'animaux.

Par ailleurs, le pH intracérébral avait également été mesuré sur une autre cohorte de rats BACHD présents dans le laboratoire par un doctorant précédent. Cette mesure avait été effectuée par spectroscopie du ^{31}P en mesurant l'écart fréquentiel entre les pics de la phosphocréatine (PCr) et du phosphate inorganique (Pi). La valeur du pH intracellulaire est alors dérivée de la relation de Henderson-Hasselbalch (De Graaf et al., 2007) :

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (\text{VIII.2})$$

avec [HA], la concentration de l'acide et $[A^-]$, la base conjuguée.

Ces travaux avaient notamment montré une stabilité du pH intracellulaire chez des rats BACHD âgés de 18 mois, avec des valeurs de 7.10 ± 0.04 et 7.11 ± 0.03 mesurées chez les rats sauvages et BACHD respectivement (Thèse de Brice Tiret). Bien que cette mesure ait été effectuée dans un voxel relativement important couvrant une grande partie du cerveau, il est raisonnable de penser que le pH n'est pas le facteur principal impactant l'effet gluCEST. Ainsi, cela suggère que les modifications observées en gluCEST sont effectivement corrélées à des variations de concentrations en glutamate et non dues à des changements de l'environnement physiologique. Cette modification n'est cependant pas visible par SRM du fait du volume partiel trop important.

2. Baisse du glutamate liée au vieillissement normal

Les cartes de variations mesurées chez les animaux contrôles montrent des baisses significatives des effets gluCEST dans différentes régions du cerveau. A première vue, cela pourrait être le signe d'une atteinte du compartiment neuronal. Or, les résultats obtenus en SRM, et en particulier la stabilité du tNAA, attestent du contraire. En effet, le glutamate est une molécule synthétisée dans les neurones grâce à une enzyme, la glutaminase, qui catalyse la réaction de la glutamine en glutamate. Le glutamate est donc considéré comme étant surtout présent dans les neurones. Ainsi, le glutamate est souvent représenté comme étant un bon marqueur du compartiment neuronal. Cependant, de nombreux exemples, et notamment les travaux de cette thèse, montrent clairement que les variations de glutamate ne sont pas toujours corrélées à celles observées pour le tNAA. C'est le cas notamment pour les souris R6/1 mais également dans d'autres modèles souris de la MH (Zacharoff et al., 2012). Par ailleurs, des études cliniques avec de jeunes adultes sains (de 20 à 35 ans), ont également démontré que la concentration en glutamate pouvait diminuer de façon significative (Marsman et al., 2013). Dans cette étude, la concentration en tNAA a également été mesurée et était stable. Cela semble confirmer que bien que majoritairement présents dans le même type cellulaire, ces métabolites peuvent présenter des variations indépendantes en raison de leurs rôles biologiques différents.

Ces résultats indiquent donc plus probablement que le niveau de glutamate est un reflet d'une activité métabolique modifiée (Segovia 2001, Zahr 2008). Les cartes de variations mesurées pour chacun des génotypes permettent de constater que les niveaux de glutamate changent au cours du temps. Ces variations semblent d'ailleurs faire écho à la tendance observée en SRM même si dans ce cas les baisses n'étaient pas significatives, sans doute à cause de la variabilité de la mesure et de la taille relativement limitée des deux cohortes d'animaux. Par ailleurs, des changements sur l'activité de régulation de la glutaminase ont déjà été rapportés au cours du vieillissement (Wallace et Dawson 1992 et 1993) pouvant conduire à une modification du cycle glutamate-glutamine (Boumezbeur et al., 2010). La tendance à l'augmentation de la glutamine, certes non significative, observée à la fois chez les rats sauvages et BACHD semble abonder dans ce sens.

3. Mise en place des mécanismes de compensation ?

L'analyse des cartes de variations des effets gluCEST chez les animaux contrôles et les animaux HD montre dans tous les cas des baisses d'effet gluCEST, reflétant des baisses de glutamate. Cependant, les décours temporels de ces variations sont très différents, en particuliers dans le striatum et le corps calleux. Si ces résultats ne permettent pas de mettre en évidence une souffrance plus importante du compartiment neuronal chez les BACHD, ils démontrent néanmoins que la présence de la huntingtine mutée *a*, à un moment donné durant le développement, eu un impact sur l'activité métabolique et l'utilisation du glutamate.

Dans le cas présent, aucun résultat n'atteste d'une quelconque souffrance ou mort neuronale dans le cerveau des rats BACHD durant les 12 premiers mois. Ceci est en accord avec les travaux déjà publiés sur ce modèle rat à des temps comparables, la neurodégénérescence n'apparaissant qu'à des stades plus avancés (Yu-Taeger et al., 2012). Néanmoins, il est intéressant de noter que les structures présentant une baisse la plus forte d'effet gluCEST sont le striatum ainsi que dans une moindre mesure le cortex et le corps calleux. Or, les neurones striataux sont connus pour être particulièrement vulnérables dans le cas de la MH et le corps calleux a été identifié comme une structure potentiellement sensible dans le modèle souris Ki140.

Par conséquent, les résultats obtenus en gluCEST orientent plus la discussion vers une réorganisation des flux métaboliques et du métabolisme énergétique en général. On peut faire l'hypothèse que durant les premiers mois, les animaux BACHD mettent en place des mécanismes de compensation visant à maintenir une production énergétique suffisante permettant d'assurer un bon fonctionnement des neurones. Cependant, ces mécanismes s'épuisent certainement plus rapidement que chez les animaux contrôles et au bout de 12 mois, il y a une décompensation brutale.

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait très intéressant de pouvoir suivre les animaux à des temps plus long. Ainsi, nous pourrions voir si les niveaux de glutamate continuent de baisser par rapport aux animaux sauvages et si cela se traduit également à plus long terme par des modifications des concentrations d'autres métabolites ou par une atrophie des tissus cérébraux. On peut notamment s'attendre à observer une baisse du tNAA à des temps plus longs, ce qui argumenterait en faveur d'une atteinte des neurones.

C. Une utilisation différente des ressources énergétique ?

Les résultats de SRM présentés dans ce manuscrit montrent pour la plupart des métabolites une étonnante stabilité des concentrations, les tendances observées n'étant pas statistiquement significatives. Le seul métabolite présentant des variations significatives est le lactate : en plus d'une baisse globale de concentration observée entre le groupe sauvage et le groupe BACHD, nous avons mesuré une diminution significative de sa concentration chez les animaux BACHD au cours du temps. Ces modifications du lactate, couplées aux autres mesures semblant montrer une intégrité des cellules cérébrales, nous ont orientés vers une hypothèse d'une utilisation différente du glucose et des besoins énergétiques entre les animaux contrôles et les BACHD. Cette hypothèse est notamment renforcée par les résultats obtenus par l'équipe à l'origine de ce modèle BACHD. En effet, ils ont démontré que,

bien que les BACHD soient obèses, leur poids durant les 12 premiers mois au moins est similaire à celui des animaux contrôles (Jansson et al., 2014). Néanmoins, les rats BACHD ont une masse musculaire plus faible et une masse grasseuse plus importante, suggérant un métabolisme périphérique global modifié. Cet effet peut s'expliquer par le rôle de la huntingtine mutée qui, via un mécanisme mettant en jeu l'hypothalamus, va déréguler la prise alimentaire et perturber l'ensemble du métabolisme (Petersén et al., 2006). Il est donc raisonnable de penser que la modification du métabolisme périphérique ait des conséquences non-négligeables sur le métabolisme cérébral, notamment lors de la phase développementale des animaux.

Pour évaluer les perturbations potentielles de la machinerie responsable de la plus grande partie de la production énergétique, nous avons utilisé un modèle d'intoxication à l'aide de l'acide 3-nitropropionique (3NP) qui inhibe l'enzyme succinate déshydrogénase qui est la sous-unité catalytique du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le 3NP, une toxine environnementale, dont les effets neurotoxiques conduisent à une dégénérescence du caudé/putamen chez l'homme, a été notamment utilisé pour reproduire certaines caractéristiques histopathologiques, métaboliques et comportementales de la MH chez le rongeur et le primate non-humain (Beal et al., 1993, Brouillet 1995, pour revue voir Brouillet 2005).

1. Protocole d'intoxication aiguë au 3NP

Les rats sont injectés de façon bilatérale dans le striatum : l'hémisphère gauche est injectée avec la toxine 3NP à 250 nmol ; l'hémisphère droit étant injecté avec du PBS qui nous sert de contrôle interne. Après l'injection, l'animal est rapidement placé dans le scanner IRM afin de mesurer alternativement les profils métaboliques dans les striatum gauche et droit.

Ce protocole a été appliqué sur les groupes de rats utilisés pour le suivi longitudinal c'est-à-dire 6 contrôles et 7 BACHD.

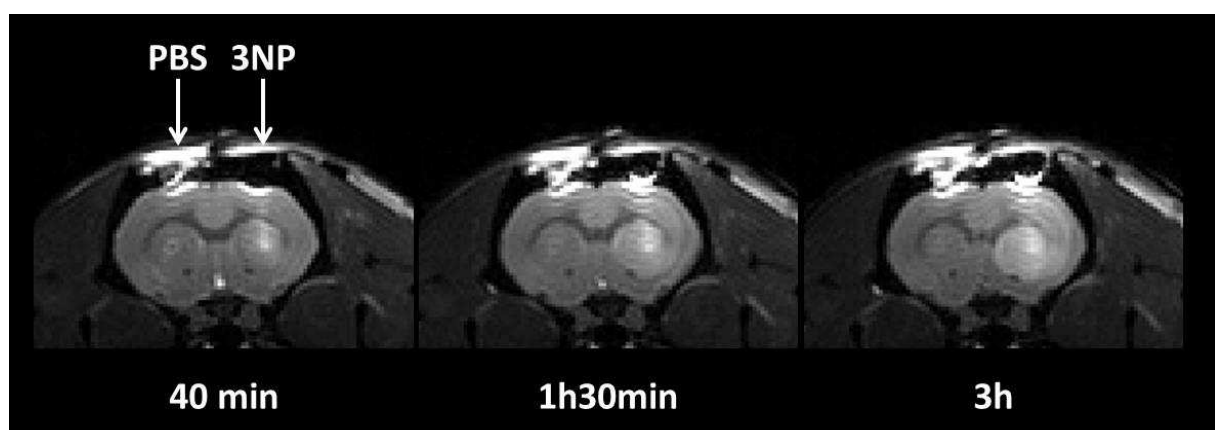


Figure VIII.16 : Images anatomiques d'un rat injecté avec la toxine 3NP dans le striatum droit à différents temps post-injection.

On observe très bien la dégradation du striatum droit suite à l'injection de la toxine 40 min après l'injection (gauche), 1h30 après injection (milieu) et enfin 3h après l'injection (droite).

2. Résultats

L'injection de 3NP provoque tout un tas de réactions qui ont un effet direct sur la concentration des métabolites. La **figure VIII.17** ne montre que les métabolites présentant des variations de concentrations suite à l'injection. Ainsi les variations du ratio tNAA/tCr, Glu/tCr et Gln/tCr ont été observés. Les données représentées en couleur sombre correspondent au profil mesuré dans la partie droite du striatum, injectée au 3NP et celles représentées en couleur pâle, correspondent au côté contrôle.

Ainsi, nous avons pu observer une légère diminution de la concentration de tNAA suite à l'injection de 3NP. Cette diminution reflète donc une atteinte très modérée du compartiment neuronal, probablement les mesures ont été faites peu de temps après l'injection. A des temps plus longs, la neurotoxine aurait probablement eu un impact plus important sur la population de neurones.

Nous avons également remarqué une baisse de Glu ainsi qu'une augmentation de Gln. Ces résultats confirment donc que le Glu peut varier sans refléter de mort neuronale : ces altérations correspondent à une modification du cycle glutamate – glutamine impliqué dans les interactions entre neurones et astrocytes.

Malgré ces changements, aucune différence significative entre les groupes n'a été observée.

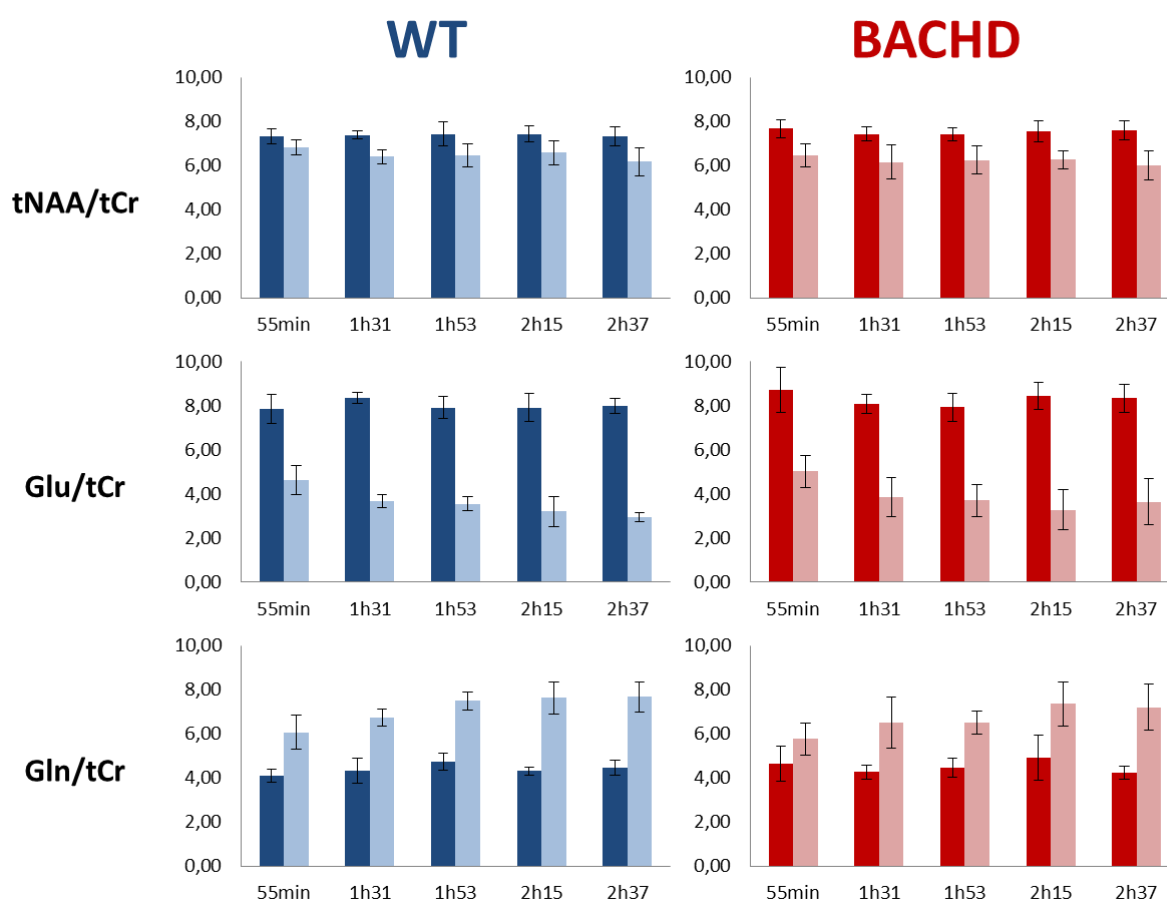


Figure VIII.17 : Evolution des concentrations de métabolites après injection de la toxine 3NP.

Les concentrations de tNAA, Glu et Gln sont mesurées dans le striatum des rats contrôles et BACHD. On observe ainsi une forte diminution de Glu et une augmentation de Gln dans la zone injectée avec le 3NP (représentée par les couleurs foncées : les autres couleurs correspondant au côté injecté avec du PBS).

3. Cas du lactate

On constate d'après la **figure VIII.18** que le lactate augmente après injection de 3NP et ce durant au moins 2h30. L'augmentation semble atteindre un plateau mais nous n'avons pas poursuivi les expériences au-delà de ce temps. Le blocage par le 3NP de la SDH conduit à une inhibition globale du cycle de Krebs. Par conséquent, le pyruvate produit par glycolyse ne peut pas être oxydé car les mitochondries ne sont plus fonctionnelles. Par conséquent, d'après les figures présentées dans le chapitre introductif, la seule voie métabolique pour le pyruvate est la conversion en lactate par la LDH. Le pyruvate est l'intermédiaire obligatoire pour entrer dans le cycle de Krebs via production de l'acétylCoA par la pyruvate déshydrogénase. Ceci est vrai quel que soit l'intermédiaire carboné utilisé à savoir le glucose ou le lactate. Par conséquent, en ralentissant ou en stoppant le cycle de Krebs, il y a une augmentation de la production de pyruvate et donc de lactate. L'augmentation de lactate pourrait aussi s'expliquer par une augmentation de la glycolyse.

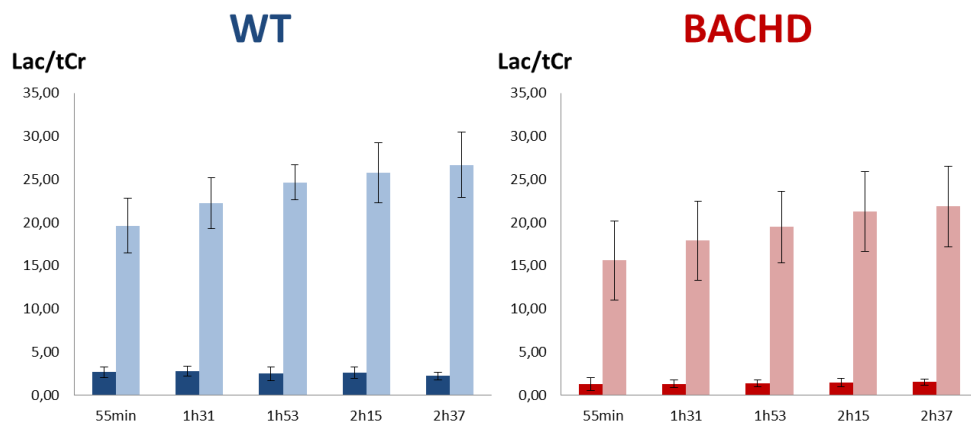


Figure VIII.18 : Altération de la concentration de lactate après injection de la toxine 3NP.

On observe une très forte augmentation du niveau de lactate après injection de 3NP (représentée par les couleurs foncées : les autres couleurs correspondant au côté injecté avec du PBS).

On voit donc qu'en présence de 3NP, le lactate est le produit de dégradation final du glucose et il est logique qu'il s'accumule rapidement. Il n'existe alors que deux voies de consommation possibles pour le lactate :

- une oxydation en pyruvate puis la reconversion en glucose. Cette voie ne correspond pas à l'inverse de la glycolyse car certaines étapes de la glycolyse sont irréversibles.
- un transport du lactate par le sang dans le foie pour subir la néoglucogénèse par le cycle de Cori.

Ainsi, en l'absence de mitochondries fonctionnelles, il est primordial pour les cellules d'orienter leur métabolisme vers la glycolyse aérobie afin de garantir une production d'ATP minimale (Schurr et al., 1997). Cette solution n'étant pas pérenne à cause du très faible rendement énergétique de la glycolyse

aérobie, il est probable que les cellules neuronales meurent au bout d'un certain temps. Cependant, nous n'avons pas poursuivi les expériences jusqu'à observer cette dégénérescence.

L'évolution du pic de lactate entre les animaux contrôles et les BACHD est intéressante. En effet, si le niveau de départ en lactate est plus bas chez les BACHD (comme nous l'avons montré précédemment), l'augmentation du lactate au cours du temps est la même dans les deux groupes, l'ANOVA à mesures répétées n'ayant pas montré d'interaction *temps x groupe* significative. Donc cela veut dire que la machinerie glycolytique responsable de la production des métabolites tricarboxyliques entrant dans le cycle de Krebs (avant la pyruvate déshydrogénase) est fonctionnelle, même chez les rats âgés de 12 mois. Cependant, ces résultats suggèrent que durant leur développement, les rats BACHD mettent en place des mécanismes de compensation du métabolisme énergétique et utilisent différemment le glucose par rapport aux animaux sauvages. Ces résultats sont cohérents avec les données rapportées dans la littérature concernant le métabolisme énergétique de neurones striataux de rats BACHD étudié en culture (Gouarné et al., 2013). En effet, lorsque les neurones sont cultivés dans un milieu enrichi en glucose dans des concentrations largement supérieures aux concentrations physiologiques (25 mM), les neurones striataux des rats BACHD présentent une capacité respiratoire comparable à celle de neurones de rats sauvages, attestant du bon fonctionnement de la machinerie produisant l'énergie nécessaire. Cependant, dans un milieu contenant des concentrations physiologiques de glucose (2,5 mM), des anomalies respiratoires apparaissent, l'oxydation seule du glucose seul n'étant plus suffisante pour soutenir la production énergétique. Par conséquent, *in vivo*, des mécanismes alternatifs permettant de compenser l'utilisation du glucose se mettent en place. Aussi, si la phosphorylation oxydative est diminuée chez les BACHD, le renouvellement des intermédiaires du cycle de Krebs est certainement diminué. Or, le glutamate est en équilibre avec l'alpha cétooglutarate intervenant dans le cycle de Krebs. Cela pourrait expliquer la baisse d'effet gluCEST constatée aux temps longs chez les BACHD et la tendance observée en SRM.

IV. Conclusion

En conclusion, le modèle rat BACHD est un modèle peu sévère et très progressif, ce qui laisse penser que le développement de la pathologie est plus proche de la MH humaine. Nous avons pu par exemple observer la mise en place de mécanismes de compensation durant la période asymptomatique. Il aurait été intéressant d'analyser cette cohorte à des temps plus long afin de voir si ces mécanismes alternatifs se dégradent jusqu'à entraîner la neurodégénérescence.

Le suivi longitudinal de ces cohortes de rats nous a permis d'avancer une hypothèse quant à l'utilisation différenciée du glucose chez les BACHD, signe d'une adaptation du métabolisme énergétique. Par conséquent, la possibilité de suivre la consommation de glucose *in vivo* serait particulièrement informative. Pour cela, la méthode standard est l'imagerie de Tomographie par Emission de Positron (TEP) utilisant un analogue du glucose, le fluorodeoxyglucose (FDG) dont un des groupements hydroxyles est remplacé par un atome de fluor radioactif (^{18}F -FDG). Une alternative séduisante à l'imagerie TEP serait d'utiliser l'effet CEST des protons $-\text{OH}$ du glucose (glucoCEST) afin de suivre la consommation de glucose par IRM avec une très bonne résolution spatiale. Le développement méthodologique de l'imagerie glucoCEST est présenté dans le chapitre suivant.

Chapitre IX : Perspectives de l'imagerie CEST

A partir des observations faites lors de l'étude des différents modèles Huntington présentés dans les chapitres **VII** et **VIII**, de nombreux indices semblent indiquer que le métabolisme énergétique est fortement mis à l'épreuve dans les maladies neurodégénératives. Durant cette thèse, nous avons ainsi pu développer certaines modalités d'imagerie CEST, en accord avec les thématiques du laboratoire, capables d'apporter des informations supplémentaires aux mesures macroscopiques réalisées en IRM classique. Dans ce chapitre, nous présentons deux principaux développements méthodologiques ayant un très grand potentiel pour l'étude des maladies neurodégénératives : l'imagerie glucoCEST, permettant de détecter le glucose qui est prépondérant dans les mécanismes de métabolisme énergétique, et enfin l'imagerie gluCEST haute-résolution, qui présente le potentiel d'imager de façon spécifique certains types cellulaires.

I. Suivi du métabolisme énergétique par imagerie glucoCEST

A. Introduction

1. Contexte

Comme présenté dans les chapitres précédents, le glucose constitue l'une des principales sources de production d'énergie pour le cerveau. Cet organe est constamment actif et nécessite donc un apport énergétique important. Dans des conditions normales, l'absorption et la consommation de glucose sont régulées avec précision, mais elles peuvent être altérées dans le contexte de conditions pathologiques comme nous l'avons illustré précédemment. De plus, des preuves convaincantes indiquent un rôle clé des défauts du métabolisme énergétique précoce dans plusieurs maladies neurodégénératives (Kuhl, 2010). Ainsi, l'absorption et la consommation de glucose par les cellules du cerveau pourraient constituer des biomarqueurs pertinents des fonctions cellulaires et permettre de mettre en évidence des perturbations durant le développement de la pathologie.

Au cours des dernières décennies, la tomographie par émission de positons (TEP) est devenue l'examen de référence pour évaluer l'absorption du glucose *in vivo*, en particulier avec l'utilisation du [^{18}F]-fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG), un analogue radiomarké du glucose. De nombreuses études ont d'ailleurs démontré son utilité clinique pour le diagnostic de maladies neurodégénératives (Nordberg et al., 2002). Cependant, en plus de l'inconvénient de la radioactivité et de l'accès limité aux systèmes d'imagerie TEP, cette technique offre une résolution spatiale limitée à ~ 1 mm. Si cette résolution est suffisante pour l'imagerie d'un cerveau humain, elle devient limitante pour des applications

précliniques, en particulier chez la souris. Bien qu'une meilleure résolution puisse être obtenue en utilisant l'autoradiographie avec des analogues du glucose marqués au ^{14}C , cette méthode nécessite le sacrifice de l'animal, ce qui rend impossible tout suivi longitudinal.

2. Imagerie CEST et glucose

Récemment, l'imagerie CEST du glucose (glucoCEST) a été proposée pour détecter les tumeurs dont le métabolisme glycolytique est privilégié (Walker-Samuels et al., 2013). Si un consensus sur la compartimentation exacte du signal glucoCEST n'a pas encore été trouvé au sein de la communauté, il est très vraisemblable que les variations du signal glucoCEST mesurées suite à l'injection intraveineuse de D-glucose soient d'origine intracellulaire (Nasrallah et al., 2013). En effet, l'injection de l'énantiomère L-glucose non transporté dans les cellules, n'induit pas de variation d'effet CEST, excluant la contribution vasculaire du glucose. De plus, l'injection de 2-désoxy-D-glucose (2DG), un analogue du glucose entrant dans les cellules avec les mêmes transporteurs mais avec un métabolisme bloqué après la première phosphorylation par l'hexokinase en 2DG-6-phosphate (2DG6P), induit une accumulation du signal glucoCEST. Cela renforce l'hypothèse d'une contribution intracellulaire et non extravasculaire/extracellulaire du signal CEST (Nasrallah et al., 2013).

B. Protocoles d'injection

Etant donné que le glucose est un métabolite naturellement présent dans l'ensemble des cellules, l'imagerie glucoCEST à l'état basal permet d'obtenir un signal. Néanmoins, l'information pertinente qui est recherchée dans un protocole d'imagerie du métabolisme énergétique est la façon dont le glucose est utilisé, c'est-à-dire comment il entre dans les cellules et comment il est consommé. En situation de repos, il y a des flux constants de glucose qui permettent d'assurer une production énergétique suffisante. Cependant, on peut considérer que la concentration moyenne est constante au cours du temps. Afin de faire varier temporellement la concentration en glucose cérébral, il est possible d'injecter du glucose et mesurer la façon dont cet excédent de glucose est métabolisé.

Durant cette thèse, nous avons évalué 2 protocoles d'administration du glucose ou d'analogue de glucose : la perfusion ou le bolus.

1. Perfusion

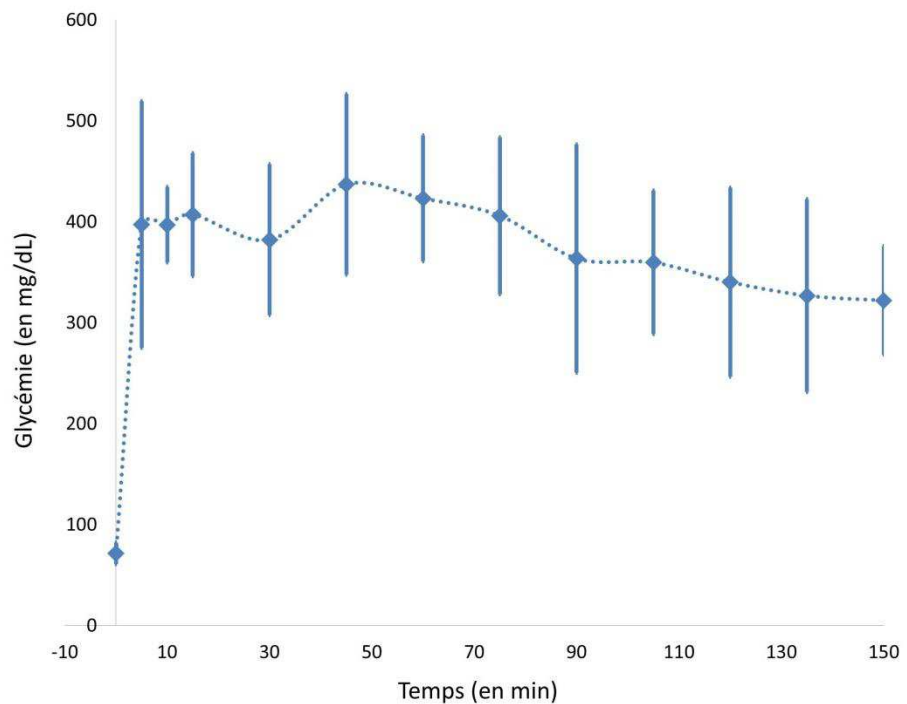
Nous avons développé un protocole de perfusion de glucose chez le rat, inspiré de celui utilisé dans la publication de (Henry et al., 2003). Tout d'abord, le rat est mis à jeun de manière à descendre son niveau de glycémie basale (entre 80 et 100 mg/dL) et est ensuite anesthésié à l'isoflurane. Deux cathéters caudaux pour les lignes de perfusion et de prélèvement sont respectivement installés sur la veine et l'artère avant de placer l'animal dans le scanner IRM. Du glucose à 20 % en masse est ensuite

injecté de manière continue pendant 2h à l'aide d'un pousse-seringue de manière à maintenir la glycémie environ quatre fois supérieure à la glycémie initiale (**Figure IX.1**).

Figure IX.1 :

Glycémie en fonction du temps pour le protocole de perfusion décrit ci-dessus.

On remarque que la glycémie reste stable à une valeur d'environ 4 fois sa valeur initiale.



2. Le bolus

On peut également injecter le glucose ou un analogue de glucose sous forme de bolus. La mise en place de l'expérimentation est la même que pour la perfusion à la différence près que le bolus est injecté en une seule fois à une dose relativement importante de 1 g/kg^{-1} .

L'idée ici est d'observer les variations du contraste glucoCEST au cours du temps après injection d'un bolus de glucose à 1 g/kg . Nous avons testé ce protocole avec du glucose et du 2DG qui est un analogue du glucose dont la métabolisation par les cellules est bloqué sous forme de 2DG6P.

C. Résultats

1. Perfusion

Nous avons donc appliqué notre protocole de perfusion chez le rat. La **figure IX.2** montre l'évolution du signal glucoCEST *in vivo* avant, pendant et après la perfusion.

On observe donc en toute logique un contraste initial très bas du fait de la mise à jeun au préalable des rats. Lorsque la perfusion est lancée, on peut voir une augmentation du contraste notamment dans le striatum. Le contraste glucoCEST reste globalement élevé pendant la perfusion de glucose et commence progressivement à diminuer à partir du moment où la perfusion est arrêtée. De façon intéressante, le niveau de contraste glucoCEST semble retrouver le niveau basal mesuré avant de

débuter l'expérience (images annotées d'un 0 sur la **figure IX.2**. Il semble donc que nous soyons bien sensibles aux variations de la concentration de glucose dans le cerveau.

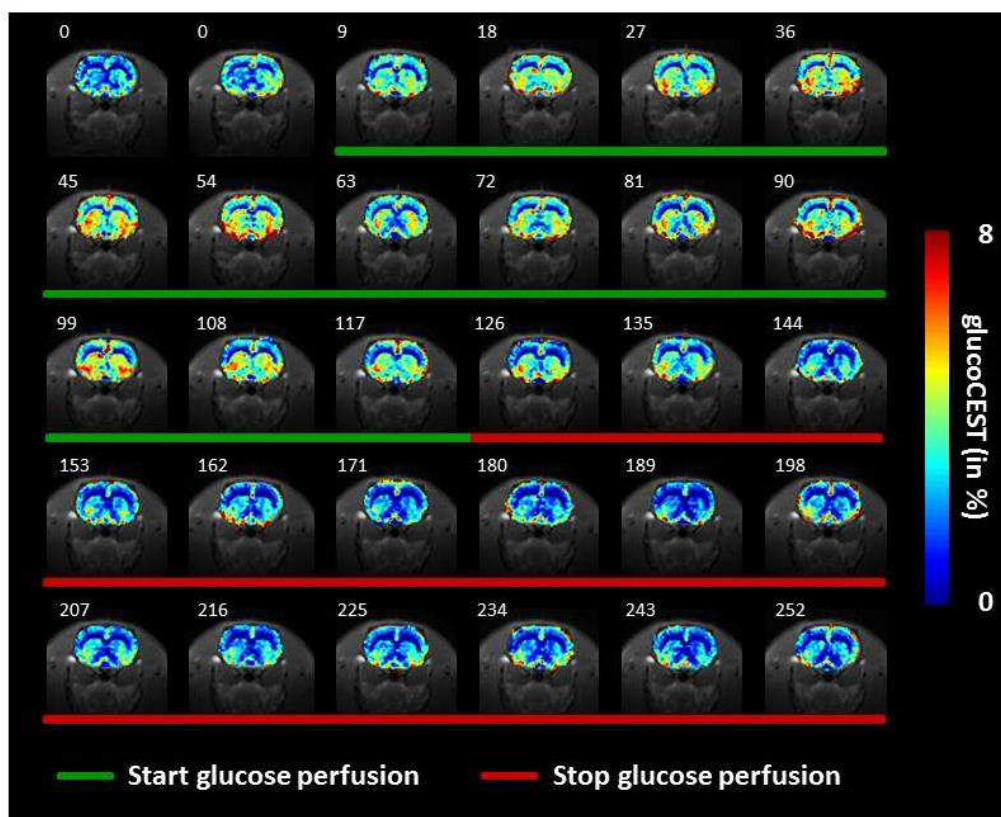


Figure IX.2 : Evolution du contraste glucoCEST pendant une perfusion de glucose dans le cerveau du rat.

Le signal glucoCEST augmente à partir du moment où la perfusion commence (images soulignées en vert) puis va progressivement diminuer lorsque la perfusion est stoppée (images soulignées en rouge). Les deux premières images en haut à gauche correspondent aux images pré-injection et forment ainsi la ligne de base (ou contraste initial) de l'étude.

2. Bolus

La perfusion de 2DG n'étant pas possible *in vivo* car une concentration trop élevée de ce produit dans le cerveau peut s'avérer toxique, nous avons donc comparé les cinétiques du 2DG et du glucose après injection d'un bolus de 1 g.kg^{-1} . Comme on peut le voir sur la **figure IX.3**, à chaque bolus de glucose injecté, le signal glucoCEST augmente et, lorsqu'on attend assez longtemps (40 min dans l'exemple présenté). L'entrée du glucose dans les compartiments extracellulaires/extravasculaire et/ou intracellulaire ne semble ici pas différente entre la matière grise et la matière blanche. En revanche, la **figure IX.3** montre clairement des décroissances différentes du signal glucoCEST entre ces deux types de structures.

Figure IX.3 : Evolution du contraste glucoCEST dans le cerveau du rat après injection d'un bolus de glucose.

Une dose de 1 g.kg^{-1} de glucose est injectée au temps $t = 0 \text{ s}$ puis une seconde environ 20 min après. Sur cette figure sont calculées les variations du signal glucoCEST dans la substance blanche (rouge) et la substance grise (bleu).

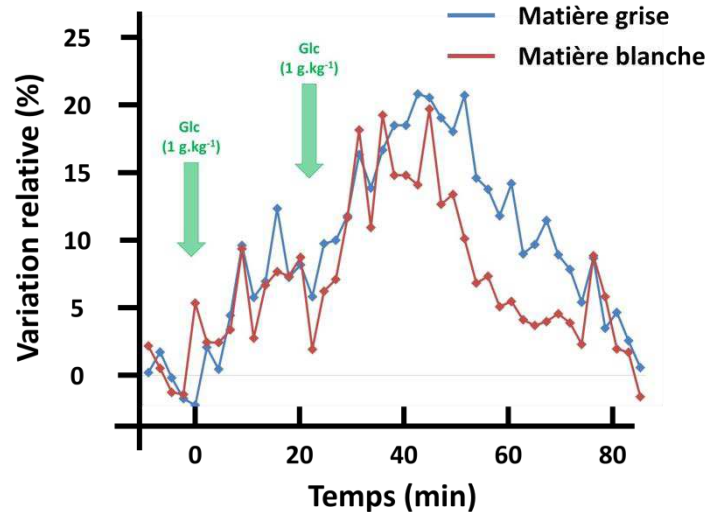
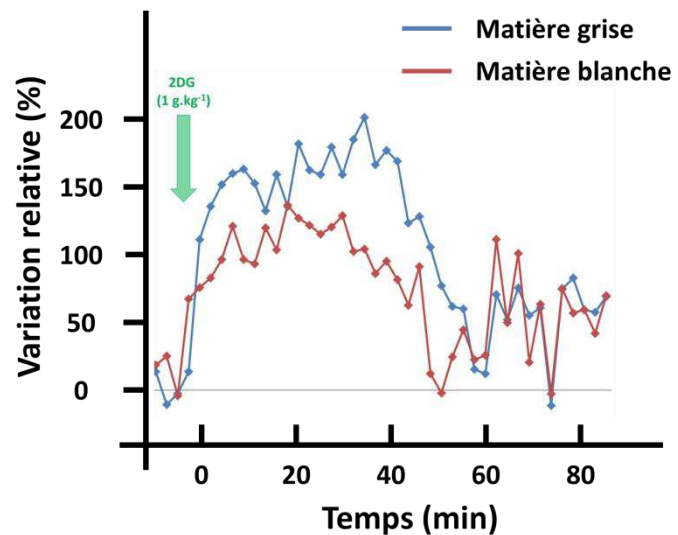


Figure IX.4 : Evolution du contraste glucoCEST dans le cerveau du rat après injection d'un bolus de 2DG.

Une dose de 1 g.kg^{-1} de 2DG est injectée au temps $t = 0 \text{ s}$. Sur cette figure sont calculées les variations du signal dans la substance blanche (rouge) et la substance grise (bleu).



Le 2DG quant à lui est transporté par les mêmes transporteurs que le glucose en dehors de l'espace vasculaire et vers l'espace intracellulaire. Cependant, il n'est pas complètement métabolisé. Le 2DG6P résultant de la phosphorylation par l'hexokinase s'accumule dans les cellules et contribue au signal glucoCEST car il possède des fonctions hydroxyles. Ainsi, l'injection d'un seul bolus permet d'obtenir une variation du contraste bien plus importante qu'avec le glucose et l'augmentation du signal semble différente dans la matière grise et la matière blanche (**Figure IX.4**). Le contraste augmente ainsi de 200 % puis finit par diminuer au bout d'une heure signifiant probablement une élimination du 2DG et de ses produits de dégradation.

D. Discussion et conclusion

1. A propos du 2DG et du glucose

La dynamique temporelle des images glucoCEST acquises pendant la perfusion de glucose semble cohérente avec une entrée constante de glucose dans les cellules lorsque la réserve de glucose sanguin reste en large excès. Lors de l'arrêt de la perfusion, le signal décroît pour retrouver son niveau de base en raison de la consommation du glucose transporté dans les cellules. Ces résultats semblent également cohérents avec les quelques articles déjà publiés dans le domaine (Nasrallah et al., 2013). Cependant, il est important de noter que ce protocole nous a paru particulièrement instable. En effet, la dynamique présentée sur la **figure IX.2** n'a pas pu être reproduite pour l'ensemble des animaux étudiés. Nous avons envisagé différents facteurs tels que l'âge des animaux, leur poids, leur régime ou leur glycémie basale mais nous n'avons pas réussi à expliquer ces variations interindividuelles. L'explication tient peut-être au fait qu'une quantité importante de glucose injectée pendant un temps relativement long peut changer l'osmolarité du compartiment sanguin (Jin et al., 2014). Par conséquent, ce choc osmotique peut induire des transferts d'eau du compartiment extracellulaire/extravasculaire vers le compartiment vasculaire pour rétablir l'osmolarité du milieu. Ainsi, le contraste CEST mesuré peut être pollué et même dominé par le transfert de protons de l'eau libre passés d'un compartiment à un autre.

Afin de limiter cet effet de choc osmotique qui perdure probablement pendant toute la durée de la perfusion de glucose, nous avons voulu évaluer le protocole d'injection sous forme de bolus. En effet, si l'osmolarité peut changer rapidement suite au bolus, il est peu probable que l'effet perdure dans le temps en raison d'équilibration des concentrations sanguine et tissulaires de glucose. L'augmentation plus importante du contraste après injection du 2DG (jusqu'à 200 %) peut s'expliquer par le fait que cette molécule s'accumule dans les corps cellulaires. Il est donc logique d'observer un signal plus important dans la matière grise que dans la matière blanche, principalement composée de fibres. Néanmoins, la décroissance du signal observée au bout de 40 min environ est plus difficilement explicable. En effet, si la décroissance observée avec le glucose pouvait s'expliquer par une consommation de celui-ci, c'est plus difficilement justifiable avec le 2DG. Cependant, il faut noter que la dose injectée en bolus est très importante, et il n'est pas à exclure que cette augmentation soudaine perturbe drastiquement le métabolisme général, avec par exemple une réponse hépatique importante. Malheureusement, nous n'avons pas pu mesurer la glycémie sanguine au cours du temps pour ces deux expériences d'injection de bolus. Cela aurait sans doute permis de fournir des indices sur la fraction de glucose ou de 2DG restant dans l'espace vasculaire.

2. Limitations

Comme nous l'avons déjà mentionné, un grand nombre de métabolites possédant des groupements hydroxyles peuvent contribuer au contraste glucoCEST. Par conséquent, la quantification des images glucoCEST reste une limite importante de la méthode. Cependant, l'intérêt ici est de mesurer des variations de signal par rapport à un niveau de base. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que l'augmentation du signal glucoCEST est uniquement due à l'injection de glucose en excès. Afin de tirer

une information quantitative de ces décours temporels, il faudrait modéliser l'entrée et la sortie du glucose à l'aide d'un modèle cinétique réversible reposant sur les équations de Michaelis-Menten. Il serait donc en théorie possible de déterminer des informations quantitatives et biologiquement intéressantes comme le taux métabolique cérébral du glucose (CMRGlc pour *Cerebral Metabolic Rate of Glucose*). Malheureusement, nous n'avons pas eu l'opportunité de développer un tel modèle pour ajuster nos données.

Par ailleurs, les études menées dans le cadre de cette thèse ont été réalisées sur des animaux anesthésiés à l'isoflurane. Or, il est connu que cet anesthésique a un impact très important sur le métabolisme cérébral (Josan et al., 2013). Des études menées en glucoCEST ont d'ailleurs montré une dépendance forte du contraste avec le niveau d'isoflurane (Nasrallah et al., 2013). Le protocole utilisé ici n'est donc certainement pas optimal mais le contraste observé dans ces conditions paraît tout de même encourageant pour de futures optimisations.

3. Conclusion

Bien qu'étant encore en phase de développement, l'imagerie glucoCEST paraît prometteuse dans le but de proposer une méthode permettant de cartographier le métabolisme du glucose *in vivo*. Cela permettrait d'offrir une alternative mieux résolue et moins coûteuse à l'imagerie TEP. Cette perspective est d'ailleurs très séduisante car elle permettrait de combler un manque. En effet, la résolution de l'imagerie TEP est limitée par le libre parcours moyen du positon avant annihilation (≈ 1 mm). Si une telle résolution permet d'imager un cerveau de rat, elle est rédhibitoire pour l'imagerie du cerveau de souris. Ainsi, l'imagerie glucoCEST permettrait de mesurer le métabolisme du glucose de façon non-invasive chez la souris et donnerait accès à la très grande variété de modèles souris de maladies neurodégénératives que l'on ne peut pas imager en TEP actuellement. De plus, il aurait été intéressant d'évaluer cette méthode sur la colonie de rats BACHD dont nous disposons. Malheureusement, cette étude n'a pas pu être effectuée par manque de temps.

II. Imagerie gluCEST haute-résolution du compartiment neuronal

Dans des conditions normales, le glutamate est traditionnellement considéré comme étant essentiellement localisé dans le compartiment neuronal. En effet, même si le glutamate libéré dans la fente synaptique est recapté par les astrocytes, sa conversion en glutamine est très rapide donc il est peu probable qu'il s'accumule dans le compartiment astrocytaire. Plusieurs études, dont celles réalisées durant cette thèse, ont déjà étudié l'intérêt de l'imagerie gluCEST pour cartographier la distribution spatiale du glutamate dans les cerveaux de rongeurs et humains et ont démontré son potentiel pour étudier les maladies neurodégénératives (Cai et al., 2012; Crescenzi et al., 2014; Pépin et al., 2016). Cependant, même si l'imagerie gluCEST « classique » offre une bonne résolution spatiale par rapport à la SRM, la taille du voxel reste encore un facteur limitant pour réaliser une cartographie haute résolution et réaliser l'image d'un compartiment neuronal « pur ».

A. Protocole

De façon intéressante, certaines structures du cerveau telles que l'hippocampe présentent des agencements cellulaires particuliers. Chez la souris, l'hippocampe est une structure hautement organisée composée de plusieurs couches cellulaires comprenant de différents types de cellules telles que les neurones ou les astrocytes. En particulier, le gyrus denté (DG, **Figure IX.5a**) et la corne d'Ammon (CA1, 2 et 3, **Figure IX.5a**) sont des couches riches en neurones contenant respectivement des cellules granulaires et des neurones pyramidaux.

Afin d'évaluer les limites de l'imagerie gluCEST en terme de résolution spatiale, nous avons profité de l'antenne cryogénique, qui permet d'obtenir un gain d'un facteur 2 environ sur le rapport SNR comparé à une antenne classique à température ambiante, pour acquérir des images de haute résolution ($100 \times 100 \times 250 \mu\text{m}^3$).

Comme montré sur l'image anatomique pondérée T_2 présentée en **figure IX.5b**, la résolution de l'image est d'ores et déjà suffisante pour visualiser l'organisation cellulaire de l'hippocampe. Après co-localisation avec une coupe histologique obtenue par un marquage Nissl qui colore les corps cellulaires (Figure IX.5c), nous avons déterminé des régions riches en neurones dans l'hippocampe (**Figure IX.5d**, pointillés).

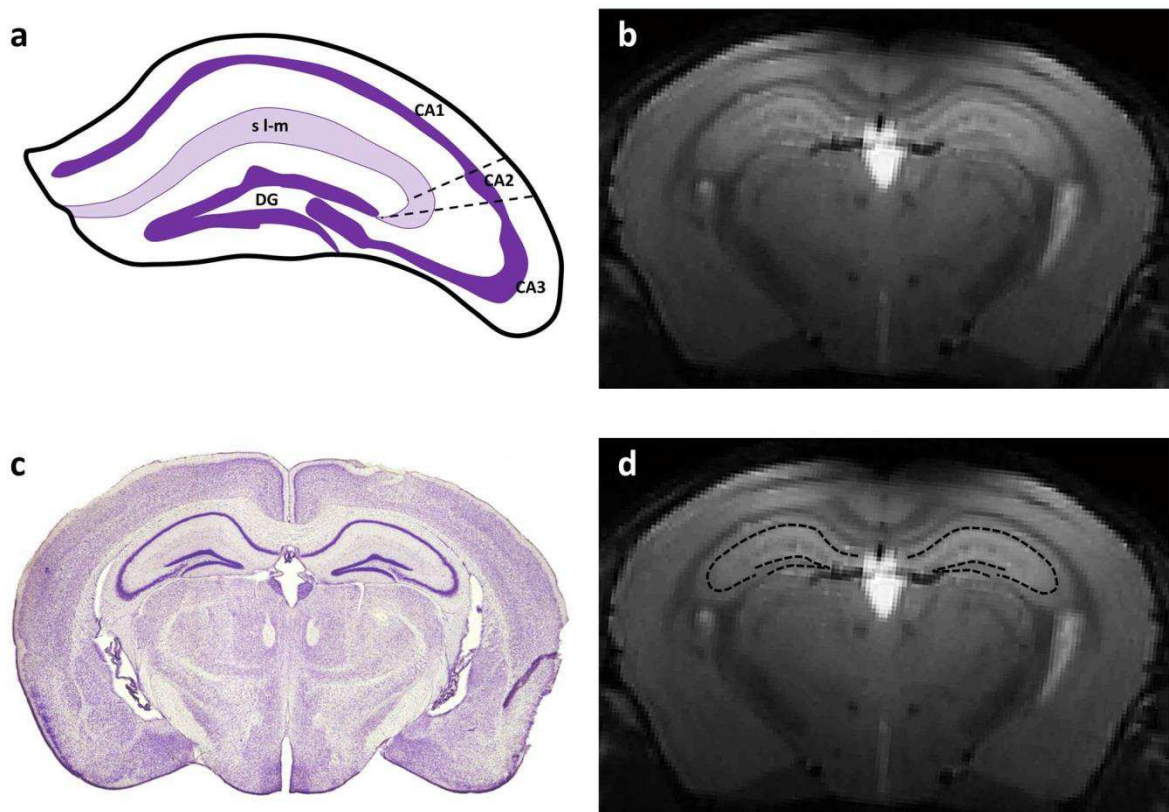


Figure IX.5 : Organisation cellulaire de l'hippocampe chez la souris.

- a. Représentation schématique des différentes couches cellulaires présentes dans l'hippocampe avec le gyrus denté (DG), la corne d'Ammon (CA) et la couche ou strate moléculaire (s l-m)
- b. Image anatomique de résolution $100 \times 100 \times 250 \mu\text{m}^3$.
- c. Coupe histologique avec marquage Nissl ciblant les corps cellulaires de neurones.
- d. Couches de corps cellulaires reportées sur l'image anatomique.

B. GluCEST haute résolution

Un exemple d'image gluCEST haute résolution est présenté sur la **figure IX.6**. Il est intéressant de noter que les zones de contraste gluCEST plus élevées correspondent très bien aux régions riches en neurones déterminées sur l'image anatomique T₂. Ces régions correspondent en particulier au gyrus denté et aux différentes régions de la corne d'Amon (**figure IX.6**, ligne pointillée).

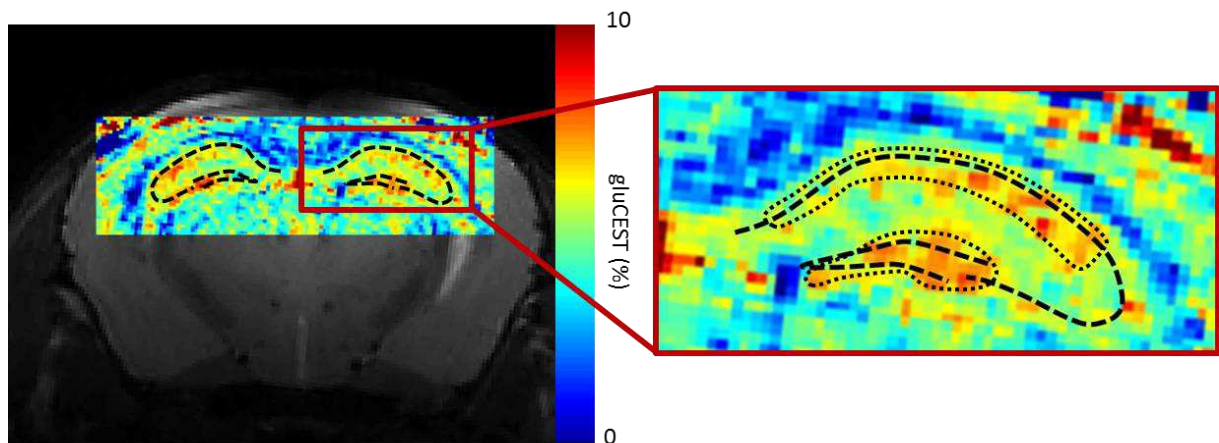


Figure IX.6 : Image gluCEST acquise dans l'hippocampe de la souris.

Les zones où le contraste gluCEST est le plus intense semblent coïncider avec la couche de corps cellulaires neuronaux (notamment pour le gyrus denté et le CA1).

Afin de mieux visualiser les effets MTRasym mesurés dans des régions présentant des niveaux différents d'effets gluCEST, nous avons dessiné manuellement des régions d'intérêt correspondant à la couche pyramidale (en bleu) et à la couche stratum lacunosum/moleculare (en rouge). Comme le montre la **figure IX.7**, un contraste gluCEST plus élevé est observé dans la couche pyramidale par rapport au stratum lacunosum/moleculare. Cela tend à confirmer que le contraste observé est bien dû à une contribution plus importante du glutamate dans cette région. En effet, la forme générale des effets MTRasym est comparable donc il est peu probable qu'une variation de pH puisse expliquer de telles différences d'effets CEST. De plus, la concentration en glutamate est certainement plus élevée dans une région riche en neurones (CA1) par rapport au stratum lacunosum/moleculare contenant moins de cellules neuronales.

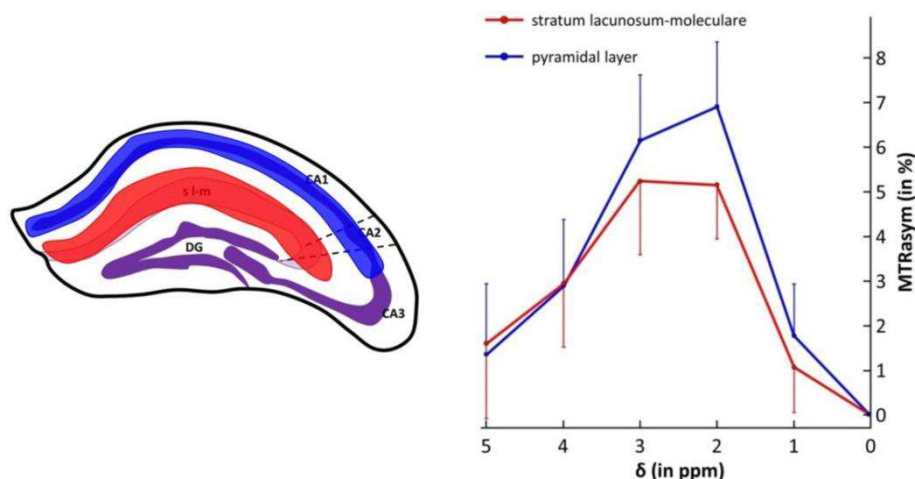


Figure IX.7 : MTRasym moyens calculés dans l'hippocampe.

Les MTRasym ont été calculés dans différentes régions de l'hippocampe : en rouge, le stratum lacunosum/moleculaire et en bleu, la couche pyramidale.

1. Une contribution axonale au contraste du glutamate ?

Il est intéressant de noter sur le zoom présenté sur la **figure IX.6** que les zones présentant un effet gluCEST important sont en réalité plus larges que la ligne pointillée représentant les seuls corps neuronaux. Toutefois, le glutamate est une molécule relativement petite qui peut diffuser dans l'espace intracellulaire. Par conséquent, on peut facilement imaginer qu'une concentration importante en glutamate soit retrouvée dans les axones. C'est d'autant plus plausible que le glutamate est stocké en grande quantité dans des vésicules à proximité des synapses pour réaliser la neurotransmission.

Afin de mieux se rendre compte de la distribution des neurones entiers (corps cellulaires et axones) dans l'hippocampe, nous avons tenté de comparer notre image gluCEST à une image tirée de la littérature obtenue avec la technique Brainbow (Livet et al., 2007). Cette technique permet de marquer de façon individuelle les neurones avec une protéine fluorescente. Les neurones sont transfectés durant l'embryogenèse avec un virus encodant pour une protéine fluorescente à une certaine longueur d'onde. Ainsi, les neurones issus des divisions successives sont « colorés » de la même couleur et on peut alors les identifier individuellement.

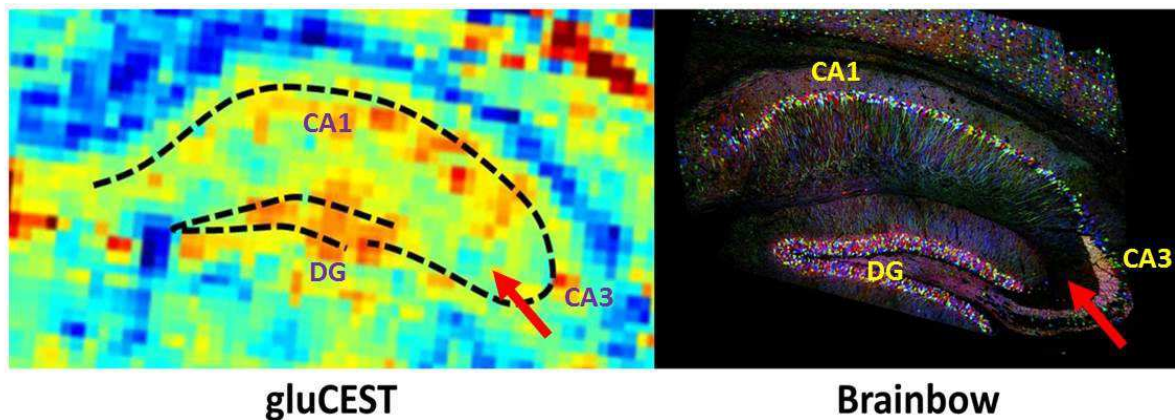


Figure IX.7 : Comparaison des images gluCEST et Brainbow de l'hippocampe de la souris.

Les zones où le contraste gluCEST est plus intense semblent correspondre aux régions possédant le plus de corps cellulaires neuronaux. De façon intéressante, le CA3 (désigné par la flèche rouge) présente un hyposignal qui semble correspondre au faible nombre de cellules et d'axones dans cette région.

La comparaison des images gluCEST et Brainbow permet de se rendre compte que la distribution du signal est comparable sur les deux images. En effet, les signaux les plus intenses sont observés dans le CA1 et le gyrus denté, là où la concentration neuronale semble être la plus importante. De plus, on observe dans la région CA3 une diminution du contraste gluCEST (**figure IX.7**, flèche rouge). Cette diminution a été systématiquement observée et n'est pas due à un artefact de B_0 . Or, la zone CA3 est une région moins dense en neurones comme en atteste l'image Brainbow. Si cela ne permet pas d'affirmer que le signal gluCEST est dû exclusivement au glutamate neuronal, cela permet tout de même d'apporter des arguments forts permettant de démontrer le potentiel de cette technique afin d'observer spécifiquement un compartiment cellulaire particulier.

2. Conclusion

Nous avons présenté ici la première preuve de concept de l'imagerie gluCEST haute-résolution. Cette application de l'imagerie gluCEST se révèle très prometteuse mais nécessite encore un certain nombre de validations notamment d'un point de vue histologique. En effet, des études complémentaires seront nécessaires afin de confirmer la spécificité du signal gluCEST. Néanmoins, le potentiel de l'imagerie métabolique haute-résolution est important et pourrait offrir de nouvelles perspectives d'études des maladies neurodégénératives, en particulier pour la maladie d'Alzheimer qui affecte de façon spécifique et précoce les neurones de l'hippocampe.

Conclusion générale

Cette thèse réalisée à MIRCen comportait essentiellement deux volets. Le premier objectif était d'implémenter une méthode IRM innovante, l'imagerie CEST, afin d'étudier de façon non-invasive et avec une excellente résolution spatiale le métabolisme cérébral chez le rat et la souris. Les développements méthodologiques réalisés ont ensuite été appliqués à différents modèles animaux de la maladie de Huntington afin d'évaluer la pertinence de l'imagerie CEST comme biomarqueur potentiel de la maladie.

Ainsi, une partie conséquente de la thèse a été consacrée au développement et à l'optimisation d'une séquence CEST robuste à haut champ magnétique (11.7T). En dehors du module d'imagerie qui est comparable aux séquences d'imagerie classiques, la partie importante de la séquence CEST réside dans le module de saturation. Les paramètres importants que sont l'intensité de la saturation (B_1), la durée de saturation (T_{sat}) et la fréquence de saturation (δ_{sat}) ont été optimisés d'abord en fantôme puis évalués *in vivo*. Les jeux de paramètres optimisés permettent maintenant d'imager avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité le glutamate, le glucose et les protons amides qui renseignent sur les variations de pH.

Le cœur de cette thèse a consisté à évaluer le potentiel de l'imagerie CEST, et en particulier de l'imagerie gluCEST dans le contexte de la maladie de Huntington. Pour cela, nous avons eu l'opportunité d'utiliser 3 modèles animaux différents reproduisant différents stades d'évolution de la maladie de Huntington. Nous avons comparé deux modèles souris, les KI140 et les R6/1. Le modèle KI140 est un modèle assez progressif qui reproduit l'évolution lente de la maladie telle qu'elle peut s'exprimer dans la forme clinique. Pour ce modèle, nous avons également eu la chance de pouvoir comparer la sévérité du modèle grâce à l'étude de souris hétérozygotes et homozygotes pour le gène encodant la protéine huntingtine mutée. Le modèle R6/1 est quant à lui sujet à une évolution beaucoup plus rapide de la maladie. Le protocole d'imagerie gluCEST développé a donc été appliqué à ces souris afin de cartographier les variations de niveau de glutamate dans le cerveau des animaux. Ces cartes de variation d'effets CEST ont été complétées par des mesures plus conventionnelles telles que le volume striatal et le profil métabolique acquis par SRM.

Les profils métaboliques acquis chez ces animaux HD des deux modèles ont permis de mettre en évidence des diminutions significatives de tNAA, un métabolite essentiellement présent dans les neurones. Cette baisse est caractéristique d'une atteinte du compartiment neuronale reflétant une souffrance ou la mort des neurones. De plus, nous avons mesuré une diminution du volume striatal chez les animaux HD cohérente avec une mort de la population neuronale. Il est intéressant de noter que si le niveau de glutamate était affecté chez les KI140, il ne l'était pas du tout chez les R6/1, signe que ces deux métabolites reflètent probablement des altérations de processus biologiques différents.

De plus, grâce à la très bonne résolution spatiale offerte par l'imagerie CEST, nous avons pu mettre en évidence que les niveaux de glutamate n'étaient pas altérés de façon homogène dans le cerveau des

souris KI140. En effet, si nous avons rapporté des baisses importantes de glutamate dans le striatum et le cortex des souris homozygotes, le corps calleux semble être la structure la plus affectée. Ceci est également vrai chez les animaux hétérozygotes, suggérant que les atteintes du corps calleux surviennent relativement tôt. Si assez peu d'études cliniques se sont intéressées à l'implication de cette structure particulière dans le cadre des maladies neurodégénératives, et en particulier dans la MH, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles pistes de recherche. Ceci est d'autant plus vrai que l'émergence des scanners à haut champ (>7T) pourra certainement faciliter le transfert de l'imagerie gluCEST vers des protocoles de recherche clinique.

Par ailleurs, l'étude avec les souris KI140 et R6/1 a permis d'illustrer la complémentarité de l'imagerie gluCEST et de la SRM pour l'identification de biomarqueurs pertinents. En effet, si la SRM permet de fournir des informations quantitatives sur un grand nombre de métabolites, elle est limitée par la résolution spatiale. A contrario, en dépit d'une spécificité moindre, l'imagerie gluCEST permet d'accéder à une information spatiale de haute importance mais peut s'avérer peu utile lorsque la concentration en glutamate est stable.

Le suivi longitudinal réalisé en SRM, imagerie gluCEST et APT sur la cohorte de rats BACHD de MIRCen pendant 1 an nous a permis de collecter un grand nombre d'informations sur ce modèle animal. Hormis la baisse significative de la concentration de lactate, les résultats de SRM font état d'une grande stabilité des concentrations des divers métabolites entre les rats BACHD et les animaux sauvages ainsi qu'au cours du temps. Ce résultat est cohérent avec la progression lente du modèle et la faible atteinte des rats BAVHD durant leur première année comme reportée dans plusieurs publications. Les variations de lactate quant à elles suggèrent un remodelage du métabolisme énergétique avec une utilisation différente du glucose chez les animaux BACHD par rapport aux animaux sauvages. Si les variations d'effets gluCEST mesurées au cours du temps (chez les animaux sauvages mais surtout chez les BACHD) sont encore difficilement explicables, elles permettent néanmoins de suggérer que l'imagerie gluCEST peut être un bon outil pour suivre les perturbations du métabolisme énergétique avec une bonne résolution spatiale.

Enfin, dans la dernière partie de cette thèse, nous avons tenté d'explorer de nouvelles applications de l'imagerie CEST. Grâce à la combinaison d'un scanner à très haut champ et l'utilisation d'une antenne cryogénique haute performance, nous avons pu repousser au maximum les limites de l'imagerie gluCEST en termes de résolution spatiale. Il est désormais possible d'acquérir des images gluCEST *in vivo* avec une excellente résolution spatiale dans le cerveau de souris, ce qui constitue, à notre connaissance, une première mondiale. Si la spécificité du signal CEST reste à valider, cette étude démontre le potentiel de l'imagerie CEST haute résolution et offre la perspective d'imager de façon spécifique certains types cellulaires. Pour finir, l'imagerie glucoCEST est certainement une des applications les plus prometteuses. Si la méthode est encore en cours de développement et n'a pas pu être évaluée sur le modèle rat BACHD, les résultats préliminaires laissent entrevoir la possibilité d'établir des cartes de consommation de glucose avec une bonne résolution.

Bibliographie

Abada, Y.K., Schreiber, R., and Ellenbroek, B. (2013). Motor, emotional and cognitive deficits in adult BACHD mice: a model for Huntington's disease. *Behav. Brain Res.* 238, 243–251.

Aime, S., Barge, A., Delli Castelli, D., Fedeli, F., Mortillaro, A., Nielsen, F.U., and Terreno, E. (2002). Paramagnetic lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magn. Reson. Med.* 47, 639–648.

Aime, S., Delli Castelli, D., and Terreno, E. (2005). Highly Sensitive MRI Chemical Exchange Saturation Transfer Agents Using Liposomes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 5513–5515.

Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Barnes, G., Bates, G.P., Lin, C.S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., and Altherr, M. (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat. Cell Mol. Genet.* 20, 27–38.

Arnold, J.T., Dharmatti, S.S., and Packard, M.E. (1951). Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds. *J. Chem. Phys.* 19, 507–507.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.

Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 15005.

Beal, M.F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58, 495–505.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., and Martin, J.B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321, 168–171.

Beal, M.F., Matson, W.R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E.A., Ogawa, T., and Bird, E.D. (1992). Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 108, 80–87.

Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738.

Bloch, F. (1946). Nuclear Induction. *Phys. Rev.* 70, 460–474.

Bolivar, V.J., Manley, K., and Messer, A. (2004). Early exploratory behavior abnormalities in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res.* 1005, 29–35.

Bossy-Wetzel, E., Petrilli, A., and Knott, A.B. (2008). Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 31, 609–616.

- Bottomley, P.A. (1987). Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 508, 333–348.
- Boumezbeur, F., Mason, G.F., de Graaf, R.A., Behar, K.L., Cline, G.W., Shulman, G.I., Rothman, D.L., and Petersen, K.F. (2010). Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 211–221.
- Boussicault, L., Hérard, A.-S., Calingasan, N., Petit, F., Malgorn, C., Merienne, N., Jan, C., Gaillard, M.-C., Lerchundi, R., Barros, L.F., et al. (2014). Impaired brain energy metabolism in the BACHD mouse model of Huntington’s disease: critical role of astrocyte–neuron interactions. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1500–1510.
- Brouillet, E., Jenkins, B.G., Hyman, B.T., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Srivastava, R., Roy, D.S., Rosen, B.R., and Beal, M.F. (1993). Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 60, 356–359.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M.F., and Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington’s disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59, 427–468.
- Cai, K., Haris, M., Singh, A., Kogan, F., Greenberg, J.H., Hariharan, H., Detre, J.A., and Reddy, R. (2012). Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat. Med.* 18, 302–306.
- Cai, K., Singh, A., Roalf, D.R., Nanga, R.P.R., Haris, M., Hariharan, H., Gur, R., and Reddy, R. (2013). Mapping glutamate in subcortical brain structures using high-resolution GluCEST MRI. *NMR Biomed.* 26, 1278–1284.
- Carter, B.J. (2005). Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum. Gene Ther.* 16, 541–550.
- Chan, D., Fox, N.C., Scahill, R.I., Crum, W.R., Whitwell, J.L., Leschziner, G., Rossor, A.M., Stevens, J.M., Cipolotti, L., and Rossor, M.N. (2001). Patterns of temporal lobe atrophy in semantic dementia and Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 49, 433–442.
- Chaumeil, M.M., Ozawa, T., Park, I., Scott, K., James, C.D., Nelson, S.J., and Ronen, S.M. (2012). Hyperpolarized ¹³C MR spectroscopic imaging can be used to monitor Everolimus treatment in vivo in an orthotopic rodent model of glioblastoma. *NeuroImage* 59, 193–201.
- Clifford, J.J., Drago, J., Natoli, A.L., Wong, J.Y.F., Kinsella, A., Waddington, J.L., and Vaddadi, K.S. (2002). Essential fatty acids given from conception prevent topographies of motor deficit in a transgenic model of Huntington’s disease. *Neuroscience* 109, 81–88.
- Cowan, C.M., and Raymond, L.A. (2006). Selective neuronal degeneration in Huntington’s disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 25–71.
- Crescenzi, R., DeBrosse, C., Nanga, R.P.R., Reddy, S., Haris, M., Hariharan, H., Iba, M., Lee, V.M.Y., Detre, J.A., Borthakur, A., et al. (2014). In vivo measurement of glutamate loss is associated with synapse loss in a mouse model of tauopathy. *NeuroImage* 101, 185–192.
- Cunningham, C.H., Pauly, J.M., and Nayak, K.S. (2006). Saturated double-angle method for rapid B1+ mapping. *Magn. Reson. Med.* 55, 1326–1333.
- Dai, Z., Ji, J., Xiao, G., Yan, G., Li, S., Zhang, G., Lin, Y., Shen, Z., and Wu, R. (2014). Magnetization Transfer Prepared Gradient Echo MRI for CEST Imaging. *PLOS ONE* 9, e112219.

- Damiano, M., Galvan, L., Déglon, N., and Brouillet, E. (2010). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 52–61.
- Dickerson, B.C., Goncharova, I., Sullivan, M.P., Forchetti, C., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Beckett, L.A., and deToledo-Morrell, L. (2001). MRI-derived entorhinal and hippocampal atrophy in incipient and very mild Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 747–754.
- Dixon, W.T., Hancu, I., Ratnakar, S.J., Sherry, A.D., Lenkinski, R.E., and Alsop, D.C. (2010). A Multislice Gradient Echo Pulse Sequence for CEST Imaging. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* 63, 253–256.
- Donahue, M.J., Donahue, P.C.M., Rane, S., Thompson, C.R., Strother, M.K., Scott, A.O., and Smith, S.A. (2016). Assessment of lymphatic impairment and interstitial protein accumulation in patients with breast cancer treatment-related lymphedema using CEST MRI. *Magn. Reson. Med.* 75, 345–355.
- Dula, A.N., Asche, E.M., Landman, B.A., Welch, E.B., Pawate, S., Sriram, S., Gore, J.C., and Smith, S.A. (2011). Development of chemical exchange saturation transfer at 7T. *Magn. Reson. Med.* 66, 831–838.
- Edzes, H.T., and Samulski, E.T. (1977). Cross relaxation and spin diffusion in the proton NMR of hydrated collagen. *Nature* 265, 521.
- El Idrissi, A., and Trenkner, E. (2004). Taurine as a modulator of excitatory and inhibitory neurotransmission. *Neurochem. Res.* 29, 189–197.
- Fahmeed Hyder, Anant B Patel, Albert Gjedde, Douglas L Rothman, Kevin L Behar, and Robert G Shulman (2006). Neuronal–Glial Glucose Oxidation and Glutamatergic–GABAergic Function. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 865–877.
- Feany, M.B., and Bender, W.W. (2000). A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398.
- Fisher, S.K., Novak, J.E., and Agranoff, B.W. (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.* 82, 736–754.
- Foos, T.M., and Wu, J.-Y. (2002). The Role of Taurine in the Central Nervous System and the Modulation of Intracellular Calcium Homeostasis. *Neurochem. Res.* 27, 21–26.
- Forsén, S., and Hoffman, R.A. (1963). Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance. *J. Chem. Phys.* 39, 2892–2901.
- Frahm, J., Merboldt, K.-D., Hänicke, W., and Haase, A. (1987). Flow suppression in rapid FLASH NMR images. *Magn. Reson. Med.* 4, 372–377.
- Francelle, L., Galvan, L., Gaillard, M.-C., Petit, F., Bernay, B., Guillermier, M., Bonvento, G., Dufour, N., Elalouf, J.-M., Hantraye, P., et al. (2015). Striatal long noncoding RNA Abhd11os is neuroprotective against an N-terminal fragment of mutant huntingtin in vivo. *Neurobiol. Aging* 36, 1601.e7-16.
- Gill, S.S., Small, R.K., Thomas, D.G., Patel, P., Porteous, R., Van Bruggen, N., Gadian, D.G., Kauppinen, R.A., and Williams, S.R. (1989). Brain metabolites as ¹H NMR markers of neuronal and glial disorders. *NMR Biomed.* 2, 196–200.

- Gouarné, C., Tardif, G., Tracz, J., Latyszenok, V., Michaud, M., Clemens, L.E., Yu-Taeger, L., Nguyen, H.P., Bordet, T., and Pruss, R.M. (2013). Early Deficits in Glycolysis Are Specific to Striatal Neurons from a Rat Model of Huntington Disease. *PLOS ONE* 8, e81528.
- Govindaraju, V., Young, K., and Maudsley, A.A. (2000). Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* 13, 129–153.
- Grad, J., Mendelson, D., Hyder, F., and Bryant, R.G. (1991). Applications of nuclear magnetic cross-relaxation spectroscopy to tissues. *Magn. Reson. Med.* 17, 452–459.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., André, V.M., Wilburn, B., Lu, X.-H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.-H., Sun, Y.E., et al. (2008). Full-Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. *J. Neurosci.* 28, 6182–6195.
- Griffin, W.S.T., and Mrak, R.E. (2002). Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.* 72, 233–238.
- Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234.
- Hahn, E.L. (1950). Spin Echoes. *Phys. Rev.* 80, 580–594.
- Hampel, H., Teipel, S.J., Alexander, G.E., Horwitz, B., Teichberg, D., Schapiro, M.B., and Rapoport, S.I. (1998). Corpus Callosum Atrophy Is a Possible Indicator of Region- and Cell Type-Specific Neuronal Degeneration in Alzheimer Disease: A Magnetic Resonance Imaging Analysis. *Arch. Neurol.* 55, 193–198.
- Haris, M., Cai, K., Singh, A., Hariharan, H., and Reddy, R. (2011). In vivo mapping of brain myo-inositol. *NeuroImage* 54, 2079–2085.
- Haris, M., Nath, K., Cai, K., Singh, A., Crescenzi, R., Kogan, F., Verma, G., Reddy, S., Hariharan, H., Melhem, E.R., et al. (2013a). Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer's disease. *NMR Biomed.* 26, 386–391.
- Haris, M., Singh, A., Cai, K., Nath, K., Crescenzi, R., Kogan, F., Hariharan, H., and Reddy, R. (2013b). MICEST: a Potential Tool for Non-invasive Detection of Molecular Changes in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Methods* 212, 87–93.
- Harper, P.S. (1992). The epidemiology of Huntington's disease. *Hum. Genet.* 89, 365–376.
- Harris, G.J., Aylward, E.H., Peyser, C.E., Pearlson, G.D., Brandt, J., Roberts-Twillie, J.V., Barta, P.E., and Folstein, S.E. (1996). Single Photon Emission Computed Tomographic Blood Flow and Magnetic Resonance Volume Imaging of Basal Ganglia in Huntington's Disease. *Arch. Neurol.* 53, 316–324.
- Henry, P.-G., Tkáč, I., and Gruetter, R. (2003). ¹H-localized broadband ¹³C NMR spectroscopy of the rat brain in vivo at 9.4 T. *Magn. Reson. Med.* 50, 684–692.
- Hobbs, N.Z., Henley, S.M.D., Ridgway, G.R., Wild, E.J., Barker, R.A., Scahill, R.I., Barnes, J., Fox, N.C., and Tabrizi, S.J. (2010). The progression of regional atrophy in premanifest and early Huntington's disease: a longitudinal voxel-based morphometry study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 756–763.

- Holbert, S., Dedeoglu, A., Humbert, S., Saudou, F., Ferrante, R.J., and Néri, C. (2003). Cdc42-interacting protein 4 binds to huntingtin: Neuropathologic and biological evidence for a role in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 2712–2717.
- Jansson, E.K.H., Clemens, L.E., Riess, O., and Nguyen, H.P. (2014). Reduced motivation in the BACHD rat model of Huntington disease is dependent on the choice of food deprivation strategy. *PLoS One* *9*, e105662.
- Jessen, F., Block, W., Träber, F., Keller, E., Flacke, S., Papassotiropoulos, A., Lamerichs, R., Heun, R., and Schild, H.H. (2000). Proton MR spectroscopy detects a relative decrease of N-acetylaspartate in the medial temporal lobe of patients with AD. *Neurology* *55*, 684–688.
- Jia, G., Abaza, R., Williams, J.D., Zynger, D.L., Zhou, J., Shah, Z.K., Patel, M., Sammet, S., Wei, L., Bahnson, R.R., et al. (2011). Amide proton transfer MR imaging of prostate cancer: a preliminary study. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* *33*, 647–654.
- Jiang, W., Zhou, I.Y., Wen, L., Zhou, X., and Sun, P.Z. (2016). A theoretical analysis of chemical exchange saturation transfer echo planar imaging (CEST-EPI) steady state solution and the CEST sensitivity efficiency-based optimization approach. *Contrast Media Amp Mol. Imaging* *11*, 415–423.
- Jin, T., Wang, P., Zong, X., and Kim, S.-G. (2013). MR imaging of the Amide-Proton Transfer effect and the pH-insensitive Nuclear Overhauser Effect at 9.4 T. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* *69*, 760–770.
- Jin, T., Mehrens, H., Hendrich, K.S., and Kim, S.-G. (2014). Mapping Brain Glucose Uptake with Chemical Exchange-Sensitive Spin-Lock Magnetic Resonance Imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *34*, 1402–1410.
- Josan, S., Park, J.M., Hurd, R., Yen, Y.-F., Pfefferbaum, A., Spielman, D., and Mayer, D. (2013). In vivo investigation of cardiac metabolism in the rat using MRS of hyperpolarized [1-¹³C] and [2-¹³C]pyruvate. *NMR Biomed.* *26*.
- Kantarci, K. (2007). ¹H magnetic resonance spectroscopy in dementia. *Br. J. Radiol.* *80 Spec No 2*, S146–152.
- Kantarci, K., Jack, C.R., Xu, Y.C., Campeau, N.G., O'Brien, P.C., Smith, G.E., Ivnik, R.J., Boeve, B.F., Kokmen, E., Tangalos, E.G., et al. (2000). Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A ¹H MRS study. *Neurology* *55*, 210–217.
- von Kienlin, M., Künnecke, B., Metzger, F., Steiner, G., Richards, J.G., Ozmen, L., Jacobsen, H., and Loetscher, H. (2005). Altered metabolic profile in the frontal cortex of PS2APP transgenic mice, monitored throughout their life span. *Neurobiol. Dis.* *18*, 32–39.
- Kim, M., Gillen, J., Landman, B.A., Zhou, J., and van Zijl, P.C.M. (2009). Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. *Magn. Reson. Med.* *61*, 1441–1450.
- Kim, M., Chan, Q., Anthony, M.-P., Cheung, K.M.C., Samartzis, D., and Khong, P.-L. (2011). Assessment of glycosaminoglycan distribution in human lumbar intervertebral discs using chemical exchange saturation transfer at 3 T: feasibility and initial experience. *NMR Biomed.* *24*, 1137–1144.

- Kogan, F., Haris, M., Debrosse, C., Singh, A., Nanga, R.P., Cai, K., Hariharan, H., and Reddy, R. (2014). In vivo chemical exchange saturation transfer imaging of creatine (CrCEST) in skeletal muscle at 3T. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 40, 596–602.
- Krebs, H.A. (1940). The citric acid cycle. *Biochem. J.* 34, 460–463.
- Krishnan, V.R. (2003). Power and moral leadership: role of self-other agreement. *Leadersh. Organ. Dev. J.* 24, 345–351.
- Kuhl, P.K. (2010). Brain Mechanisms in Early Language Acquisition. *Neuron* 67, 713–727.
- Law, R.O. (1998). The role of taurine in the regulation of brain cell volume in chronically hyponatraemic rats. *Neurochem. Int.* 33, 467–472.
- Lazic, S.E., Goodman, A.O.G., Grote, H.E., Blakemore, C., Morton, A.J., Hannan, A.J., van Dellen, A., and Barker, R.A. (2007). Olfactory abnormalities in Huntington's disease: decreased plasticity in the primary olfactory cortex of R6/1 transgenic mice and reduced olfactory discrimination in patients. *Brain Res.* 1151, 219–226.
- Lerch, J.P., Carroll, J.B., Dorr, A., Spring, S., Evans, A.C., Hayden, M.R., Sled, J.G., and Henkelman, R.M. (2008). Cortical thickness measured from MRI in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage* 41, 243–251.
- Li, B.S.Y., Wang, H., and Gonen, O. (2003). Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn. Reson. Imaging* 21, 923–928.
- Li, J.Y., Popovic, N., and Brundin, P. (2005). The Use of the R6 Transgenic Mouse Models of Huntington's Disease in Attempts to Develop Novel Therapeutic Strategies. *NeuroRx* 2, 447–464.
- Liddel, U., and Ramsey, N.F. (1951). Temperature Dependent Magnetic Shielding in Ethyl Alcohol. *J. Chem. Phys.* 19, 1608–1608.
- Liepinsh, E., and Otting, G. (1996). Proton exchange rates from amino acid side chains— implications for image contrast. *Magn. Reson. Med.* 35, 30–42.
- Lin, C.-H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.-M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.-J., Albin, R.L., and Detloff, P.J. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 137–144.
- Lione, L.A., Carter, R.J., Hunt, M.J., Bates, G.P., Morton, A.J., and Dunnett, S.B. (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 10428–10437.
- Lyoo, I.K., Satlin, A., Lee, C.K., and Renshaw, P.F. (1997). Regional atrophy of the corpus callosum in subjects with Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Psychiatry Res.* 74, 63–72.
- Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron* 86, 883–901.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., et al. (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.

- Marsman, A., Mandl, R.C.W., van den Heuvel, M.P., Boer, V.O., Wijnen, J.P., Klomp, D.W.J., Luijten, P.R., and Hilleke E., H.P. (2013). Glutamate changes in healthy young adulthood. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23, 1484–1490.
- McBride, J.L., Ramaswamy, S., Gasmi, M., Bartus, R.T., Herzog, C.D., Brandon, E.P., Zhou, L., Pitzer, M.R., Berry-Kravis, E.M., and Kordower, J.H. (2006). Viral delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves behavior and protects striatal neurons in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9345–9350.
- McConnell, H.M. (1958). Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Phys.* 28, 430–431.
- Mcgeer, E.G., and Mcgeer, P.L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263, 517.
- McMahon, M.T., Gilad, A.A., DeLiso, M.A., Cromer Berman, S.M., Bulte, J.W.M., and van Zijl, P.C.M. (2008). New “multicolor” polypeptide diamagnetic chemical exchange saturation transfer (DIACEST) contrast agents for MRI. *Magn. Reson. Med.* 60, 803–812.
- Menalled, L., and Brunner, D. (2014). Animal models of Huntington's disease for translation to the clinic: best practices. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 29, 1375–1390.
- Menalled, L., El-Khodori, B.F., Patry, M., Suárez-Fariñas, M., Orenstein, S.J., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X.W., MacDonald, M., et al. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol. Dis.* 35, 319–336.
- Menalled, L.B., Sison, J.D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., and Chesselet, M.-F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J. Comp. Neurol.* 465, 11–26.
- Miller, J.D., Cline, R.A., and Heinzen, D.J. (1993). Photoassociation spectrum of ultracold Rb atoms. *Phys. Rev. Lett.* 71, 2204–2207.
- Moberg, P.J., Pearlson, G.D., Speedie, L.J., Lipsey, J.R., Strauss, M.E., and Folstein, S.E. (1987). Olfactory recognition: differential impairments in early and late Huntington's and Alzheimer's diseases. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 9, 650–664.
- Mochel, F., and Haller, R.G. (2011). Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J. Clin. Invest.* 121, 493–499.
- Mochel, F., Charles, P., Seguin, F., Barritault, J., Coussieu, C., Perin, L., Le Bouc, Y., Gervais, C., Carcelain, G., Vassault, A., et al. (2007). Early Energy Deficit in Huntington Disease: Identification of a Plasma Biomarker Traceable during Disease Progression. *PLoS ONE* 2.
- Nasrallah, F.A., Pagès, G., Kuchel, P.W., Golay, X., and Chuang, K.-H. (2013). Imaging Brain Deoxyglucose Uptake and Metabolism by Glucocest MRI. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1270–1278.
- Naver, B., Stub, C., Møller, M., Fenger, K., Hansen, A.K., Hasholt, L., and Sørensen, S.A. (2003). Molecular and behavioral analysis of the R6/1 Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience* 122, 1049–1057.

- Oz, G., and Tkáč, I. (2011). Short-echo, single-shot, full-intensity proton magnetic resonance spectroscopy for neurochemical profiling at 4 T: validation in the cerebellum and brainstem. *Magn. Reson. Med.* 65, 901–910.
- Parker, J.A., Connolly, J.B., Wellington, C., Hayden, M., Dausset, J., and Neri, C. (2001). Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13318–13323.
- Paulsen, J.S., Langbehn, D.R., Stout, J.C., Aylward, E., Ross, C.A., Nance, M., Guttman, M., Johnson, S., MacDonald, M., Beglinger, L.J., et al. (2008). Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 874–880.
- Pedersen, P.L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 211–222.
- Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629.
- Pépin, J., Francelle, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., de Longprez, L., Gipchtein, P., Cambon, K., Valette, J., Brouillet, E., and Flament, J. (2016). In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage* 139, 53–64.
- Pouladi, M.A., Morton, A.J., and Hayden, M.R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 708–721.
- Provencher, S.W. (1993). Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 30, 672–679.
- Ramaswamy, S., McBride, J.L., and Kordower, J.H. (2007). Animal Models of Huntington's Disease. *ILAR J.* 48, 356–373.
- Rosas, H.D., Koroshetz, W.J., Chen, Y.I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M.E., Caplan, K., Marek, K., Seidman, L.J., Makris, N., et al. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* 60, 1615–1620.
- Rosas, H.D., Salat, D.H., Lee, S.Y., Zaleta, A.K., Pappu, V., Fischl, B., Greve, D., Hevelone, N., and Hersch, S.M. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain J. Neurol.* 131, 1057–1068.
- Ruocco, H.H., Lopes-Cendes, I., Li, L.M., Santos-Silva, M., and Cendes, F. (2006). Striatal and extrastriatal atrophy in Huntington's disease and its relationship with length of the CAG repeat. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 39, 1129–1136.
- Saar, G., Zhang, B., Ling, W., Regatte, R.R., Navon, G., and Jerschow, A. (2012). Assessment of glycosaminoglycan concentration changes in the intervertebral disc via chemical exchange saturation transfer. *NMR Biomed.* 25, 255–261.
- Scahill, R.I., Schott, J.M., Stevens, J.M., Rossor, M.N., and Fox, N.C. (2002). Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: Unbiased analysis of fluid-registered serial MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4703–4707.

Schilling, G., Becher, M.W., Sharp, A.H., Jinnah, H.A., Duan, K., Kotzuk, J.A., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Cooper, J.K., Jenkins, N.A., et al. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 8, 397–407.

Schmitt, B., Zbýn, S., Stelzeneder, D., Jellus, V., Paul, D., Lauer, L., Bachert, P., and Trattnig, S. (2011). Cartilage quality assessment by using glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer and (23)Na MR imaging at 7 T. *Radiology* 260, 257–264.

Schröder, L., Lowery, T.J., Hilty, C., Wemmer, D.E., and Pines, A. (2006). Molecular imaging using a targeted magnetic resonance hyperpolarized biosensor. *Science* 314, 446–449.

Schuff, N., Amend, D.L., Meyerhoff, D.J., Tanabe, J.L., Norman, D., Fein, G., and Weiner, M.W. (1998). Alzheimer Disease: Quantitative H-1 MR Spectroscopic Imaging of Frontoparietal Brain. *Radiology* 207, 91–102.

Simmons, M.L., Frondoza, C.G., and Coyle, J.T. (1991). Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience* 45, 37–45.

Slotboom, J.W., and Streutker, G. (1991). Physical aspects of charge coupled devices. *Phys. Scr.* 1991, 281.

Slow, E.J., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S.H., Graham, R.K., Deng, Y., Oh, R., Bissada, N., Hossain, S.M., Yang, Y.-Z., et al. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1555–1567.

Snoussi, K., Bulte, J.W.M., Guéron, M., and van Zijl, P.C.M. (2003). Sensitive CEST agents based on nucleic acid imino proton exchange: detection of poly(rU) and of a dendrimer-poly(rU) model for nucleic acid delivery and pharmacology. *Magn. Reson. Med.* 49, 998–1005.

Solomon, I. (1955). Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* 99, 559–565.

Southwell, A.L., Warby, S.C., Carroll, J.B., Doty, C.N., Skotte, N.H., Zhang, W., Villanueva, E.B., Kovalik, V., Xie, Y., Pouladi, M.A., et al. (2013). A fully humanized transgenic mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 22, 18–34.

Southwell, A.L., Skotte, N.H., Villanueva, E.B., Østergaard, M.E., Gu, X., Kordasiewicz, H.B., Kay, C., Cheung, D., Xie, Y., Waltl, S., et al. (2017). A novel humanized mouse model of Huntington disease for preclinical development of therapeutics targeting mutant huntingtin alleles. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1115–1132.

Stollberger, R., and Wach, P. (1996). Imaging of the active B1 field in vivo. *Magn. Reson. Med.* 35, 246–251.

Strange, K., Emma, F., Paredes, A., and Morrison, R. (1994). Osmoregulatory changes in myo-inositol content and Na⁺/myo-inositol cotransport in rat cortical astrocytes. *Glia* 12, 35–43.

Sturrock, A.M., Hunter, E., Milton, J.A., Eimf, Johnson, R.C., Waring, C.P., and Trueman, C.N. (2015). Quantifying physiological influences on otolith microchemistry. *Methods Ecol. Evol.* 6, 806–816.

Sugars, K.L., and Rubinsztein, D.C. (2003). Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet. TIG* 19, 233–238.

- Sun, P.Z., and Sorensen, A.G. (2008). Imaging pH using the chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI: Correction of concomitant RF irradiation effects to quantify CEST MRI for chemical exchange rate and pH. *Magn. Reson. Med.* *60*, 390–397.
- Sun, P.Z., Zhou, J., Sun, W., Huang, J., and van Zijl, P.C.M. (2005). Suppression of lipid artifacts in amide proton transfer imaging. *Magn. Reson. Med.* *54*, 222–225.
- Sun, P.Z., Wang, E., and Cheung, J.S. (2012). Imaging acute ischemic tissue acidosis with pH-sensitive endogenous amide proton transfer (APT) MRI—Correction of tissue relaxation and concomitant RF irradiation effects toward mapping quantitative cerebral tissue pH. *NeuroImage* *60*, 1–6.
- Sun, P.Z., Lu, J., Wu, Y., Xiao, G., and Wu, R. (2013). Evaluation of the dependence of CEST-EPI measurement on repetition time, RF irradiation duty cycle and imaging flip angle for enhanced pH sensitivity. *Phys. Med. Biol.* *58*, N229.
- Tabrizi, S.J., Reilmann, R., Roos, R.A.C., Durr, A., Leavitt, B., Owen, G., Jones, R., Johnson, H., Craufurd, D., Hicks, S.L., et al. (2012). Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *Lancet Neurol.* *11*, 42–53.
- Tabrizi, S.J., Scahill, R.I., Owen, G., Durr, A., Leavitt, B.R., Roos, R.A., Borowsky, B., Landwehrmeyer, B., Frost, C., Johnson, H., et al. (2013). Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol.* *12*, 637–649.
- Tadros, M.G., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, A.B., and Arafa, H.M.M. (2005). Neuroprotective effect of taurine in 3-nitropropionic acid-induced experimental animal model of Huntington's disease phenotype. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *82*, 574–582.
- Teipel, S.J., Bayer, W., Alexander, G.E., Zebuhr, Y., Teichberg, D., Kulic, L., Schapiro, M.B., Möller, H.-J., Rapoport, S.I., and Hampel, H. (2002). Progression of corpus callosum atrophy in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *59*, 243–248.
- Thurston, J.H., Sherman, W.R., Hauhart, R.E., and Kloepper, R.F. (1989). myo-inositol: a newly identified nonnitrogenous osmoregulatory molecule in mammalian brain. *Pediatr. Res.* *26*, 482–485.
- Trono, D. (2000). Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther.* *7*, 20–23.
- Vaishnavi, S.N., Vlassenko, A.G., Rundle, M.M., Snyder, A.Z., Mintun, M.A., and Raichle, M.E. (2010). Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17757–17762.
- Walker-Samuel, S., Ramasawmy, R., Torrealdea, F., Rega, M., Rajkumar, V., Johnson, S.P., Richardson, S., Gonçalves, M., Parkes, H.G., Årstad, E., et al. (2013). In vivo imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat. Med.* *19*, 1067–1072.
- Ward, K.M., and Balaban, R.S. (2000). Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn. Reson. Med.* *44*, 799–802.
- Wheeler, V.C., Auerbach, W., White, J.K., Srinidhi, J., Auerbach, A., Ryan, A., Duyao, M.P., Vrbanc, V., Weaver, M., Gusella, J.F., et al. (1999). Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 115–122.

Wiltshire, K., Foster, S., Kaye, J.A., Small, B.J., and Camicioli, R. (2005). Corpus callosum in neurodegenerative diseases: findings in Parkinson's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* *20*, 345–351.

Woessner, D.E., Zhang, S., Merritt, M.E., and Sherry, A.D. (2005). Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magn. Reson. Med.* *53*, 790–799.

Wolff, S.D., and Balaban, R.S. (1989). Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magn. Reson. Med.* *10*, 135–144.

Xu, X., Yadav, N.N., Knutsson, L., Hua, J., Kalyani, R., Hall, E., Laterra, J., Blakeley, J., Strowd, R., Pomper, M., et al. (2015). Dynamic Glucose-Enhanced (DGE) MRI: Translation to Human Scanning and First Results in Glioma Patients. *Tomogr. J. Imaging Res.* *1*, 105–114.

Yu-Taeger, L., Petrasch-Parwez, E., Osmand, A.P., Redensek, A., Metzger, S., Clemens, L.E., Park, L., Howland, D., Calaminus, C., Gu, X., et al. (2012). A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 15426–15438.

Zabel, B.A., Wang, Y., Lewén, S., Berahovich, R.D., Penfold, M.E.T., Zhang, P., Powers, J., Summers, B.C., Miao, Z., Zhao, B., et al. (2009). Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands. *J. Immunol.* *183*, 3204–3211.

Zacharoff, L., Tkac, I., Song, Q., Tang, C., Bolan, P.J., Mangia, S., Henry, P.-G., Li, T., and Dubinsky, J.M. (2012). Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 502–514.

Zhang, S., Zhou, K., Huang, G., Takahashi, M., Sherry, A.D., and Gao, J. (2013). A Novel Class of Polymeric pH-Responsive MRI CEST Agents. *Chem. Commun. Camb. Engl.* *49*, 6418–6420.

Zhao, J.M., Har-el, Y., McMahon, M.T., Zhou, J., Sherry, A.D., Sgouros, G., Bulte, J.W.M., and van Zijl, P.C.M. (2008). Size-induced enhancement of chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast in liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 5178–5184.

Zhao, N., You, J., Zeng, Z., Li, C., and Zu, Y. (2013). An Ultra pH-Sensitive and Aptamer-Equipped Nanoscale Drug-Delivery System for Selective Killing of Tumor Cells. *Small* *9*, 3477–3484.

Zhou, J. (2011). Amide proton transfer imaging of the human brain. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *711*, 227–237.

Zhou, I.Y., Wang, E., Cheung, J.S., Zhang, X., Fulci, G., and Sun, P.Z. (2017). Quantitative chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI of glioma using Image Downsampling Expedited Adaptive Least-squares (IDEAL) fitting. *Sci. Rep.* *7*, 84.

Zhou, J., Lal, B., Wilson, D.A., Laterra, J., and van Zijl, P.C.M. (2003). Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors. *Magn. Reson. Med.* *50*, 1120–1126.

Zhou, J., Zhu, H., Lim, M., Blair, L., Quinones-Hinojosa, A., Messina, S.A., Eberhart, C.G., Pomper, M.G., Laterra, J., Barker, P.B., et al. (2013). Three-dimensional amide proton transfer MR imaging of gliomas: Initial experience and comparison with gadolinium enhancement. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* *38*, 1119–1128.

van Zijl, P.C.M., Jones, C.K., Ren, J., Malloy, C.R., and Sherry, A.D. (2007). MRI detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4359–4364.

Zu, Z., Li, K., Janve, V.A., Does, M.D., and Gochberg, D.F. (2011). Optimizing pulsed-chemical exchange saturation transfer imaging sequences. *Magn. Reson. Med.* *66*, 1100–1108.



In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease



Jérémy Pépin^{a,b}, Laetitia Francelle^{a,b}, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage^{a,b}, Lucie de Longprez^{a,b}, Pauline Gipchtein^{a,b}, Karine Cambon^{a,b}, Julien Valette^{a,b}, Emmanuel Brouillet^{a,b}, Julien Flament^{a,c,*}

^a Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), Molecular Imaging Research Center (MIRcen), F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

^c Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), UMS 27, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2016

Revised 10 June 2016

Accepted 14 June 2016

Available online 16 June 2016

Keywords:

Chemical exchange saturation transfer

GluCEST

Huntington's disease

Glutamate

Mouse model

Neurodegenerative disease

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disease characterized by motor, cognitive and psychiatric symptoms. Atrophy of the striatum has been proposed for several years as a biomarker to assess disease progression in HD gene carriers. However, it does not provide any information about the biological mechanisms linked to HD pathogenesis. Changes in brain metabolites have been also consistently seen in HD patients and animal models using Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS), but metabolite measurements are generally limited to a single voxel. In this study, we used Chemical Exchange Saturation Transfer imaging of glutamate (gluCEST) in order to map glutamate distribution in the brain of a knock-in mouse model (Ki140CAG) with a precise anatomical resolution. We demonstrated that both heterozygous and homozygous mice with pathological CAG repeat expansion in gene encoding huntingtin exhibited an atrophy of the striatum and a significant alteration of their metabolic profile in the striatum as compared to wild type littermate controls. The striatal decrease was then confirmed by gluCEST imaging. Surprisingly, CEST imaging also revealed that the corpus callosum was the most affected structure in both genotype groups, suggesting that this structure could be highly vulnerable in HD. We evaluated for the first time gluCEST imaging as a potential biomarker of HD and demonstrated its potential for characterizing metabolic defects in neurodegenerative diseases in specific regions.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disorder characterized by involuntary abnormal movements, as well as cognitive and psychiatric symptoms associated with early atrophy of the striatum and cerebral cortex (Harper, 1991; Walker, 2007). The mutation causing HD consists of an abnormal expansion of a CAG repeat in the gene coding the protein huntingtin (htt). There is no therapy to slow the progression of the disease which is fatal in 10–15 years after the onset of symptoms in young individuals. Despite active research in the past twenty years, the mechanisms underlying brain dysfunction and degeneration remain poorly understood. Mutation of huntingtin affects many cellular processes such as transcription (Sugars and Rubinsztein, 2003), neurotransmission, calcium homeostasis (Cowan and Raymond, 2006), autophagy and energy metabolism (Bossy et al.,

2008; Damiano et al., 2010; Mochel et al., 2007; Mochel and Haller, 2011) in both neurons and astrocytes.

There is a limited number of methods allowing precise follow up of disease progression and understanding of physiopathological pathways. Clinical assessments along with neuroimaging techniques are likely the most robust criteria to characterize disease severity in HD patients. For instance, the atrophy of the striatum as measured by MRI is currently the best biomarker of disease progression in HD gene carriers (Aylward et al., 2004; Paulsen et al., 2008; Tabrizi et al., 2013). However, although anatomical alterations seen by MRI can be found many years before onset of symptoms in HD gene carriers, they do not provide any information about the biological mechanisms linked to HD pathogenesis. In the case of clinical trials, morphometric MRI might be crucial to determine whether the therapy modifies or slows down atrophy but does not give rapid indication about biological efficacy of the treatment. Thus, there is a need to develop novel “functional” imaging modalities. Defects in brain energy metabolism have been consistently found in HD patients and animal models. In particular, Positron Emission Tomography (PET) studies demonstrated large reduction in glucose consumption in the caudate/putamen in HD patients (Brouillet et al.,

* Corresponding author at: MIRcen, 18 route du Panorama – BP n° 6, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

E-mail address: julien.flament@cea.fr (J. Flament).

1999; Kuwert et al., 1989, 1990). Nonetheless, non-invasive in vivo methods to more broadly characterize energy metabolism in HD are rare. In vivo Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) can provide key insights of pathological molecular processes related to cell metabolism. Analysis of human HD cohorts or transgenic mouse models of HD using in vivo ^1H or ^{31}P MRS methods suggested early metabolic changes in the brain (Jenkins et al., 1998; Mochel et al., 2012; Sturrock et al., 2010; Zacharoff et al., 2012). Interestingly, several studies using ^1H MRS showed that the concentrations of glutamate and *N*-acetyl-aspartate, two metabolites mainly located in neurons, were decreased in HD patients and animal models (Jenkins et al., 1998, 2000, 2005). Glutamate is the major excitatory transmitter in the central nervous system and is involved in several aspects of normal brain functions including cognition, memory and learning. Its concentration in the brain is higher than all other amino acids (around 10 mmol/kg), and it plays a central role in brain metabolism (Sonnewald, 2014). Regulatory system of glutamate concentration in the brain is very complex (Magistretti and Allaman, 2015). In normal conditions, most of glutamate is located in cells, neurotransmission being governed by few micromolar of extracellular glutamate. Glutamate can become toxic if extracellular concentration is too high. In such case, glutamate overactivates ionotropic glutamate receptors, and producing major rise in Ca^{2+} concentration in the cytoplasm of neurons, triggers excitotoxicity (Beal, 2005; Brouillet et al., 1999; Cowan and Raymond, 2006). Thus, mechanisms to maintain low extracellular concentration are crucial for brain functions. In addition to its major role as an excitatory neurotransmitter, glutamate is central to several metabolic pathways related to energy metabolism and oxidative stress. For instance, it is involved in many crucial biological pathways such as the tricarboxylic acid (TCA) cycle (it is in exchange with TCA cycle intermediate α -ketoglutarate), regulation of glutathione synthesis and astrocyte–neuron interactions. Consequently, glutamate concentration has to be precisely regulated and a small defect can be very deleterious for the brain.

In this context, ^1H MRS has been widely used to precisely monitor alterations of metabolic profiles and particularly glutamate concentration. However, one important limitation of MRS is that glutamate measurements are confined to relatively large voxels, due to limited sensitivity of the method. Thus, it would be of major interest to find functional biomarkers related to energy metabolism that could be monitored in the entire brain and with good anatomical resolution in HD animal models or gene carriers. Recently, CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) has been proposed to indirectly detect dilute molecules with labile protons (Ward et al., 2000; Ward and Balaban, 2000; Wolff and Balaban, 1990). Exchangeable protons, for example amine ($-\text{NH}_2$) or amide ($-\text{NH}$) groups, exhibit a resonance frequency that is shifted relative to bulk proton frequency. Likewise, exchangeable protons can be selectively saturated using radiofrequency (RF) pulse, leading to a decrease of water signal due to magnetization exchange. The potential of CEST imaging to map glutamate level has already been demonstrated in both rodent and human brains at high magnetic fields ($\geq 7\text{ T}$) (Cai et al., 2012, 2013; Carrillo-de Sauvage et al., 2015). It is thus possible to map local alteration in glutamate concentrations, which may be a potential indicator of regional energy defects in vivo.

Here, we investigated whether gluCEST could represent a relevant biomarker of HD. To do so, we studied a knock-in (Ki) mouse model of HD. Several Ki mouse models have already been described in the literature expressing various length of CAG triplet, from 50 to 175 (Lin et al., 2001; Menalled, 2005; Wheeler et al., 2002). These Ki mice are usually characterized by the slowly progressive appearance of the symptoms, which mimics more closely human HD pathology than severe and rapid mouse models (Lin et al., 2001; Menalled and Chesselet, 2002; Menalled et al., 2003; Wheeler et al., 2000). In the present study, we developed and applied gluCEST imaging to examine brain glutamate concentrations in a slowly progressing mouse model of HD, the Ki mice expressing chimeric mouse/human exon 1 containing

140 CAG repeats inserted in the murine Htt gene (Ki140CAG) (Menalled et al., 2003).

Materials and methods

Ki140CAG and wild type littermate mice

Mice were housed in a temperature-controlled room maintained on a 12 h light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. All animal studies were conducted according to the French regulation (EU Directive 2010/63/EU – French Act Rural Code R 214-87 to 131). The animal facility was approved by veterinarian inspectors (authorization n° A 92-032-02) and complies with Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW – n°A5826-01). All procedures received approval from the ethical committee (authorization n°2015060417243726v1 (APAFIS#770).

In the present study, we used knock-in mice expressing chimeric mouse/human exon 1 containing 140 CAG repeats inserted in the murine Htt gene (Ki140CAG). Ki140CAG mice colony was maintained by breeding heterozygotes Ki140CAG males and females (Menalled et al., 2003). Mice were N3 (B6) on a 129 Sv $\times$ C57BL/6J background. Genotype was determined from PCR of tail snips taken at 10–15 days of age for Ki140CAG mice. The resulting mice of our colony were divided in 2 groups depending on their genotype; heterozygous and homozygous for the Htt gene. Ki140CAG mice were compared to their wild type (WT) littermate controls.

Preliminary behavioral testing of the Ki140CAG mouse colony

Open-field test

We used groups of WT ($n = 3$, 3 females), heterozygous ($n = 5$, 3 females, 2 males), and homozygous ($n = 8$, 5 females, 3 males) mice. The three groups of 7–15 month-old mice were matched for age (mean $\pm$ SEM in months: WT, 9.33 ± 1.86 ; heterozygous, 11.10 ± 2.68 ; homozygous, 11.81 ± 0.72) and were not statistically different in body weight (mean $\pm$ SEM in grams: WT, 27.30 ± 0.51 ; heterozygous, 29.05 ± 2.9 ; homozygous 26.47 ± 1.21). We assessed the spontaneous locomotor activity of Ki140CAG mice in an automated Ethovision XT/open-field apparatus (Noldus). Mice were transferred to the testing room and allowed to acclimate for at least 30 min before testing. The open-field consisted of a square arena ($50 \times 50\text{ cm}$, 40 cm high). The floor was divided into two virtual concentric parts, with an inner zone in the middle of the arena ($25 \times 25\text{ cm}$) and an outer zone extending from the outer edge of the inner zone to the walls of the structure. Animals were placed in the center of the arena at the start of the test. Locomotor activity was monitored for 10 min with a video camera mounted on the ceiling directly above the center of the arena. The floor of the arena was washed with 70% ethanol between tests, to remove the odor of the previous subject. A computerized tracking system (Ethovision XT, Noldus IT) calculated total locomotion, speed, and time spent immobile by image analysis. We also recorded duration of rearing and grooming behavior during the 10 min trial by visual inspection of the behavior of each animal using time encoded video recording (the Observer, Noldus).

Rotarod test

We used groups of WT ($n = 5$, 4 females, 1 male), heterozygous ($n = 9$, 1 female, 8 males), and homozygous ($n = 10$, 4 females, 6 males) mice. Mice were different from those used for the open-field test. The three groups of 10–13 month-old mice were matched for age (mean $\pm$ SEM in months: WT, 10.60 ± 1.03 ; heterozygous, 11.10 ± 0.33 ; homozygous, 11.50 ± 0.52) and were not statistically different in body weight (mean $\pm$ SEM in grams: WT, 28.22 ± 0.79 ; heterozygous, 28.03 ± 0.74 ; homozygous 26.27 ± 0.83). The rotarod test was used to evaluate the motor coordination and strength of the mice.

Mice were trained on a rotarod (MED-Associates Rota-Rod) at 4 rotations per minute (rpm) for 5 min. They were then tested in three consecutive trials, each lasting 5 min, in which the speed of the rod was increased from 4 to 40 rpm. Mice were allowed to recover for 45 min between trials. The latency to fall (in second) in the three trials was recorded for each mouse. Values were averaged across all trials. This sequence was repeated on three consecutive days.

Immunohistochemistry

Mice received a lethal dose of sodium pentobarbital solution (50 µg per gram body weight, intraperitoneal). The brain of the animals were removed, left-hemisphere was post-fixed overnight in 4% PFA in phosphate buffer (PB) solution, then cryoprotected by immersion in 30% sucrose for 36 h. Free-floating 30-µm serial coronal sections throughout the striatum were collected serially (interspace, 240 µm), with a freezing sliding microtome (SM2400; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Brain slices were placed in a storage solution (30% glycerol, 30% ethylene glycol in 0.1 M PB) and stored at -20°C before use. Brain slices were pretreated in 0.3% H_2O_2 , blocked in 4.5% NGS (Sigma), and incubated for 48 h at 4°C with primary antibodies directed against NeuN (1:2000, mouse; Millipore) or EM48 (1:200, mouse; Millipore). After rinsing, brain slices were incubated with biotinylated secondary anti-mouse antibody (1:1000; Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. Finally, they were incubated with the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) and revealed with the DAB kit (Vector Laboratories).

Anatomical MRI and proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS)

High resolution MRI and ^1H MRS experiments were performed on a horizontal 11.7 T Bruker scanner (Bruker, Ettlinger, Germany). We used groups of 12-month-old WT ($n = 5$, 5 males), heterozygous ($n = 5$, 4 females, 1 male), and homozygous ($n = 5$, 4 females, 1 male) mice. Mice were different from those used for behavioral tests. Mice were anesthetized using 3% isoflurane in a 1:1 gas mixture of air/ O_2 and positioned in a dedicated stereotaxic frame with mouth and ear bars to prevent any movements during MR acquisitions. 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, USA) during scanning. The isoflurane level was adjusted around 1.5% to keep the respiratory rate in the range of 60 to 80 per minute. A quadrature cryoprobe (Bruker, Ettlinger, Germany) was used for radiofrequency transmission and reception. High resolution anatomical T_2 -weighted images acquired with Multi Slices Multi Echoes (MSME) sequence (TE/TR = 5/2500 ms, 17 echoes, effective TE = 45 ms, in-plane resolution = $70 \times 70 \mu\text{m}^2$, 25 slices with thickness = 300 µm) in coronal orientation were used for accurate delineation of structures. The same high resolution images were used to accurately position a voxel of $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ in the left striatum. The homogeneity of the magnetic field was performed using Bruker MAPSHIM routine and good shimming was reached in the voxel (between 10.5 and 15 Hz). ^1H MRS acquisitions were performed using a LASER (Localization by Adiabatic Selective Refocusing) sequence (echo time (TE)/repetition time (TR) = 20/5000 ms combined with VAPOR water suppression. Metabolites spectra were acquired using 128 repetitions for a total scan time of 10 min. Metabolite concentrations were quantified using LCModel (Provencher, 1993) and the macromolecule (MM) spectrum of a control mouse was determined by metabolite nulling and included in the base set for LCModel. The following metabolites were reliably quantified (Cramér-Rao lower bound (CRLB) < 5% in all experiments): total choline (glycerophosphocholine + phosphocholine + choline, tCho), total creatine (creatine + phosphocreatine, tCr), glutamate (Glu), glutamine (Gln), myo-inositol (Ins), total *N*-acetyl-aspartate + *N*-acetyl-aspartyl-glutamate

(NAA + NAAG, tNAA) and taurine (Tau). Metabolite concentrations were normalized with respect to 8 mM tCr.

Chemical Exchange Saturation Transfer imaging of glutamate (gluCEST)

GluCEST was performed on the same magnet with a volume coil for radiofrequency transmission and a quadrature surface coil for reception (Bruker, Ettlinger, Germany). Three gluCEST images centered on the mid-striatum were acquired with a 2D fast spin-echo sequence preceded by a frequency-selective continuous wave saturation pulse ($150 \times 150 \mu\text{m}^2$ in-plane resolution, 0.6 mm slice thickness, echo time = 6 ms, repetition time = 5000 ms, 10 echoes and effective echo time = 30 ms). The MAPSHIM routine was applied in a voxel encompassing the slices of interest in order to reach a good shim on gluCEST images. GluCEST images were acquired with a saturation pulse applied during $T_{\text{sat}} = 1$ s, composed by 10 broad pulse of 100 ms, with 20 µs inter-delay and an amplitude $B_1 = 5 \mu\text{T}$. The frequency of the saturation pulse $\Delta\omega$ was applied in a range from -5 ppm to 5 ppm with a step of 0.5 ppm. A set of CEST images was also acquired with a weak saturation amplitude ($B_1 = 0.2 \mu\text{T}$) around the water frequency ($\Delta\omega$ in a range from -1 ppm to 1 ppm with a step of 0.1 ppm) in order to correct for B_0 inhomogeneities using the Water Saturation Shift Reference (WASSR) method (Kim et al., 2009). Before gluCEST protocol, a B_1 map was acquired with the double angle method (Stollberger and Wach, 1996). Two images with long repetition time (TR = 15.000 ms) were acquired with preparation pulses flip angles of either 30° or 60° . The same normalization method, using RF pulse amplitude for a flip angle of 30° ($B_{1\text{ref}}$), as proposed in the literature was used to calculate relative B_1 map ($B_1/B_{1\text{ref}}$, unitless) (Cai et al., 2012). In vivo, CEST contrast can be hampered by several competing factors such as direct saturation transfer (DS) of free water and background magnetization transfer (MT). Although DS is symmetrical with respect to water frequency and its contribution to CEST contrast can be suppressed by asymmetrical analysis (van Zijl and Yadav, 2011; Zhou and van Zijl, 2006), it is not always the case for MT background. However, it has been shown that MT asymmetry was minimized with high saturation amplitude (Sun et al., 2005), which is the case for gluCEST imaging ($B_1 = 5 \mu\text{T}$).

Data processing and statistical analyses

All image processing and analyses were performed using in-house programs developed on MATLAB software (MathWorks Inc., Natick, MA). Striatum was manually delineated slice-by-slice by a single operator using high resolution images and volume was calculated for each animal.

CEST images were processed pixel-by-pixel and analyzed using in-house programs developed on MATLAB software used to generate Z-spectra by plotting the longitudinal magnetization as a function of saturation frequency. WASSR method was used to generate absolute B_0 map by finding the actual frequency within each voxel. Z-spectrum in each voxel was interpolated using a cubic spline and B_0 map was used to correct for B_0 inhomogeneities. The specific glutamate contribution was isolated using Asymmetrical Magnetization Transfer Ratio (MTRasym) (Liu et al., 2010) and was calculated as follows: $\text{MTRasym}(\Delta\omega) = 100 \times (M_{\text{sat}}(-\Delta\omega) - M_{\text{sat}}(+\Delta\omega)) / M_{\text{sat}}(-5 \text{ ppm})$, $M_{\text{sat}}(\pm\Delta\omega)$ being the magnetization acquired with saturation pulse applied at '+' or '-' $\Delta\omega$ ppm. GluCEST images were calculated with $\Delta\omega$ centered at ± 3 ppm. In order to perform regional analysis of gluCEST contrast, several Regions of Interest (ROIs) were manually drawn with help of the Allen mouse brain atlas. Segmentation was performed slice-by-slice by a single operator using the reference CEST image acquired without saturation. Variation of gluCEST contrast between WT littermates vs. heterozygous mice or between WT littermates vs. homozygous mice was calculated in each ROI as

follows: $\text{Variation} = 100 \times (\text{MTRasym}(\text{WT}) - \text{MTRasym}(\text{Ki140CAG})) / \text{MTRasym}(\text{WT})$.

Statistical analyses were performed using Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software. Mean and standard error of the mean of all measures are reported in mean $\pm$ SEM format throughout. The Shapiro–Wilk test was used to test the data for normality and no deviation from normality was observed for any data. One-way ANOVA (factorial) was used to compare mean values (striatal volume, metabolite ratios measured by ^1H MRS, gluCEST contrast and open-field data) of each genotype groups. For the analysis of the rotarod data, one-way ANOVA with repeated measures (days 1, 2 and 3) was used. The significant threshold was set to 0.05. ANOVA was followed by a Fisher's Least Significant Difference (LSD) post-hoc test to determine individual significant differences between groups.

Results

Behavioral tests and histology

In the rotarod test, both heterozygous and homozygous mice showed significantly poorer performance than WT littermates (Fig. 1.a, green and red lines respectively). Homozygous and heterozygous mice appeared similarly affected when comparing the latency to fall (approximately 35% reduction) with that of WT littermates (heterozygous, $p < 0.0001$; homozygous, $p < 0.006$).

In the open-field, locomotor behavior was characterized by the duration of the rearing behavior, the duration of grooming behavior and the total distance travelled during the trials (Fig. 1.b, c and d respectively). Both heterozygous and homozygous mice showed poorer

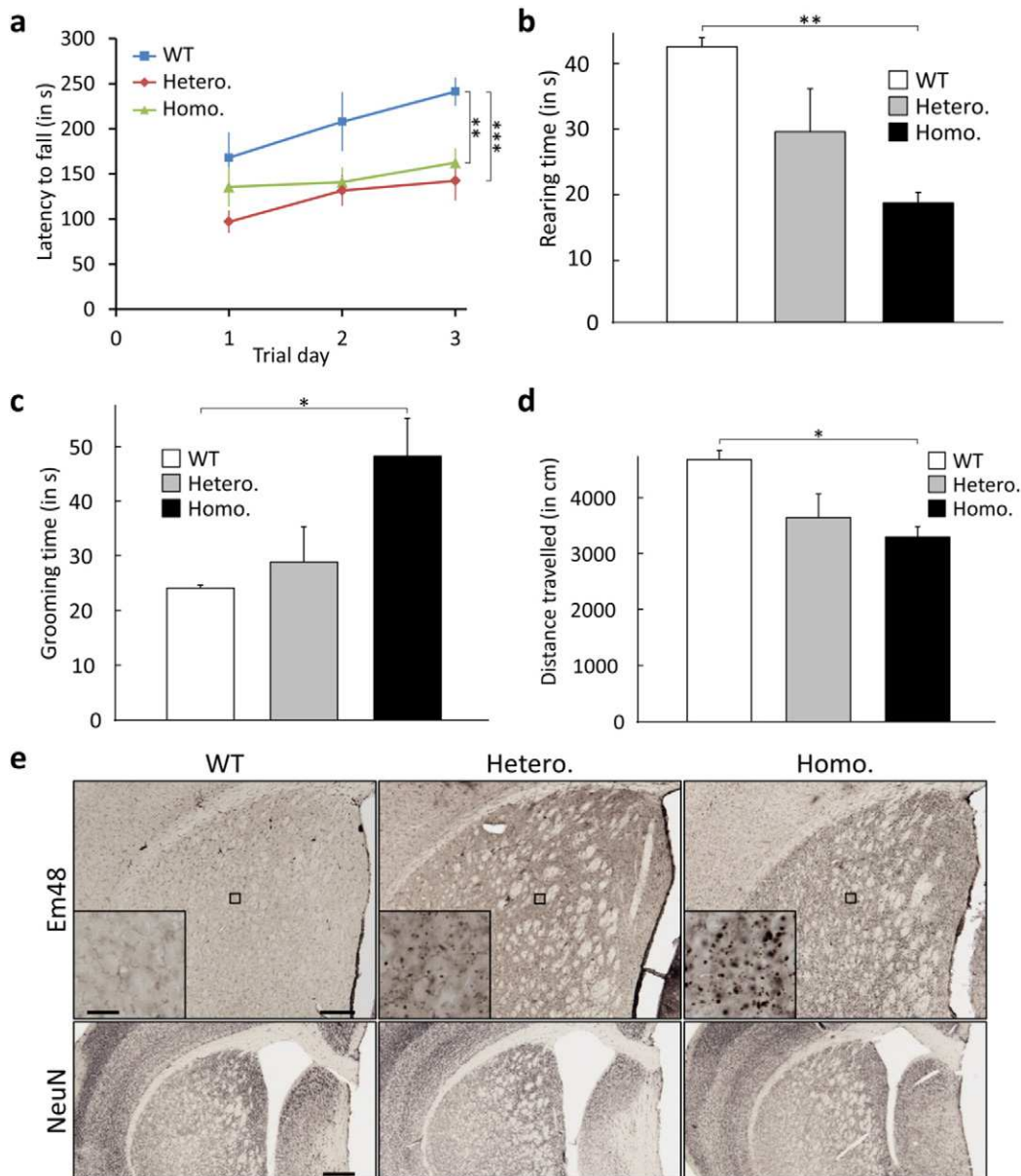


Fig. 1. Behavioral and histological characterization of Ki140CAG mouse colony. a) Rotarod test was used to evaluate the motor coordination and strength of WT littermate controls, heterozygous and homozygous mice (blue, green and red curves respectively, mean $\pm$ SEM, $n = 5, 9$ and 10 respectively). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA (repeated measures over days 1, 2 and 3, significant threshold set to 0.05) with Fisher's LSD post-hoc test ($***p < 0.001$; $**p < 0.01$; $*p < 0.05$). b–d) Open-field test was used to evaluate locomotor activity of WT littermate controls, heterozygous and homozygous mice (white, gray and black bars respectively, mean $\pm$ SEM, $n = 3, 5$ and 8 respectively): rearing time (b), grooming time (c) and distanced travelled (d). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA (factorial analysis, significant threshold set to 0.05) with Fisher's LSD post-hoc test ($***p < 0.001$; $**p < 0.01$; $*p < 0.05$). e) Representative images of immunostaining for Em48 (mutant huntingtin-containing inclusions, zoom in the black box, top panel) and NeuN (neurons, bottom panel). Scale bar: small panels = $20 \mu\text{m}$; large panels = $250 \mu\text{m}$ for Em48 and $400 \mu\text{m}$ for NeuN images.

performance as compared to WT littermates: the rearing behavior and the total distance moved were reduced (Fig. 1.b and d respectively) while grooming behavior was increased (Fig. 1.c). Statistical analysis showed that homozygous mice were significantly different from WT littermates (rearing duration, $p < 0.003$; grooming duration, $p < 0.05$; distance moved, $p < 0.02$) while there was only a trend in heterozygous mice.

We also checked that the Ki140CAG mice of our colony had huntingtin-containing aggregates, a hallmark of the pathology in HD patients. Consistent with pioneering observations (Menalled et al., 2003), we observed numerous mutant huntingtin-containing inclusions in striatum and cerebral cortex of adult Ki140CAG mice. Qualitatively, homozygous mice displayed a much higher density of inclusions as compared to heterozygous mice (Fig. 1.e, top panel). Qualitative analysis of sections stained for NeuN immunohistochemistry, a neuronal marker, neither indicated major neuronal loss nor major striatal atrophy in Ki140CAG mice when compared to WT littermates (Fig. 1.e, bottom panel).

Striatal volume by MRI

Previous studies have already demonstrated that brain atrophy can occur several years before disease onset in HD gene carriers or early in rodent HD models (Boussicault et al., 2014; Lerch et al., 2008; Rocher et al., 2016; Sawiak et al., 2009). Among all structures known to degenerate in HD, the striatum is probably the most affected and its volume has been proposed as a reliable biomarker of HD progression (Hobbs et al., 2010; Paulsen et al., 2008). In this study, we measured the striatum volume of all mice in order to document brain alteration in Ki140CAG mice at 12 month of age. The mean striatal volume of WT littermates, heterozygous and homozygous mice were respectively $18.7 \pm 0.7 \text{ mm}^3$, $16.8 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ and $14.8 \pm 0.8 \text{ mm}^3$ (Fig. 2, white, gray and black bars respectively). Homozygous mice exhibited a significant 20.9% decrease of striatal volume compare to WT littermates ($p = 0.002$) whereas the decrease was not significant in heterozygous group in spite of a trend to striatum atrophy (-10.1% , $p = 0.11$).

^1H MRS

Raw spectra acquired with the cryoprobe in the left striatum of one mouse of each group are shown in Fig. 3 (WT mouse: left panel; heterozygous mouse: middle panel; homozygous mouse: right panel). The metabolic profiles acquired in WT littermates, heterozygous and homozygous mice groups are shown in Fig. 4 (white, gray and black

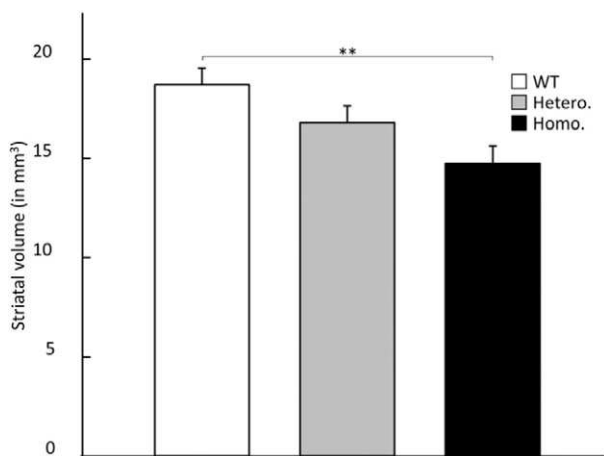


Fig. 2. Striatal atrophy measured by MRI. Striatal volume was measured in WT littermate controls, heterozygous and homozygous mice (white, gray and black bars respectively, mean $\pm$ SEM, $n = 5$ for each group). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA (significant threshold set to 0.05) with Fisher's LSD post-hoc test (** $p < 0.01$).

bars respectively). The most striking changes were decreases of Tau and tNAA metabolites in both HD mice groups. Tau exhibited a significant -25.9% decrease ($p = 0.003$) and a significant -33.3% decrease ($p = 0.0002$) in heterozygous and homozygous Ki140CAG mice respectively and tNAA exhibited a significant -17.4% decrease ($p = 0.009$) and a significant -24.3% decrease ($p = 0.0007$) in heterozygous and homozygous Ki140CAG mice respectively. A significant -13.0% decrease ($p = 0.03$) of Glu was also seen in heterozygous Ki140CAG mice. In homozygous mice, Glu concentrations were reduced by -14.9% but this did not reach statistical significance ($p = 0.06$). Finally, we measured a significant 27.4% ($p = 0.01$) increase of Gln and a significant -21.7% ($p = 0.03$) decrease of tCho in homozygous mice. The same trends were observed in heterozygous mice but they did not reach statistical significance.

gluCEST

An example of gluCEST images acquired at three slice positions in each group of mice and corresponding z -spectrum and MTRasym are shown in Fig. 5. The gluCEST contrast was comparable throughout the three slices (Fig. 5.a). The gluCEST maps from Ki140CAG mice exhibited decreased gluCEST contrast across the whole brain, reflecting a decrease of glutamate concentration. The decrease of gluCEST contrast in heterozygous mice seemed to be smaller than that in homozygous (Fig. 5.a). The mean B_0 shift (0.03 ± 0.03 ppm, Fig. 5.b) and ratio B_1/B_{1ref} (0.99 ± 0.02 , Fig. 5.c) measured into imaging slices showed the rather good homogeneity of B_0 and B_1 fields through the brain. A ROI was drawn manually in the striatum of each mouse and the z -spectrum and Asymmetrical Magnetization Transfer Ratio (MTRasym) curve were obtained for these mice (Fig. 5.d and e respectively). Z -spectra and MTRasym confirmed the more intense gluCEST contrast in the WT littermate mouse compare to heterozygous or homozygous mice (Fig. 5.d and e, blue, red and green lines respectively). Mean MTRasym of WT littermates, heterozygous and homozygous mice groups were calculated in the striatum (Fig. 6.a, blue, red and green lines respectively) and in the corpus callosum (Fig. 6.b, blue, red and green lines respectively). Mean MTRasym curves calculated for each group of mice confirmed the lower gluCEST contrast in homozygous mice observed on individual images. They also confirmed the intermediate gluCEST contrast level in heterozygous mice. Moreover, one can observe that gluCEST contrast at 3 ppm was approximately 20% higher in striatum (mostly gray matter, GM) than in corpus callosum (white matter, WM). This result is consistent with previous gluCEST studies showing higher gluCEST contrast in GM than in WM due to higher glutamate concentrations in GM (Cai et al., 2012, 2013).

In order to perform regional analysis of gluCEST contrast, several Regions of Interest (ROIs) were manually drawn based on the T_2 -weighted reference image. The following structures were delineated: striatum, corpus callosum, motor cortex, piriform cortex, septal nuclei, somatosensory cortex, hypothalamus and substantia innominata (Fig. 7, top panel). Variations of mean gluCEST contrast (expressed in percentage) measured in each ROI were calculated between control WT littermates vs. heterozygous mice and between control WT littermates vs. homozygous mice and reported on a "variation map of gluCEST contrast" for each group of mice (Fig. 7 bottom left and right maps respectively). These variations and corresponding p -values are also given in Table 1. These maps clearly evidenced the existence of differential reductions of Glu in different regions of the brain. They also underscored a "gene-dose" effect; the decrease of glutamate throughout the brain being milder in heterozygous mice than in homozygous mice. The decrease of gluCEST contrast measured in left and right striatum of homozygous mice was significant (-10.7% ($p = 0.040$) and -12.7% ($p = 0.056$) respectively) whereas it did not reach statistical significance for heterozygous mice. Pronounced decreases of gluCEST contrast were also measured in left and right piriform cortices (-11.0% ($p = 0.078$) and -14.0% ($p = 0.015$) respectively) in homozygous mice whereas

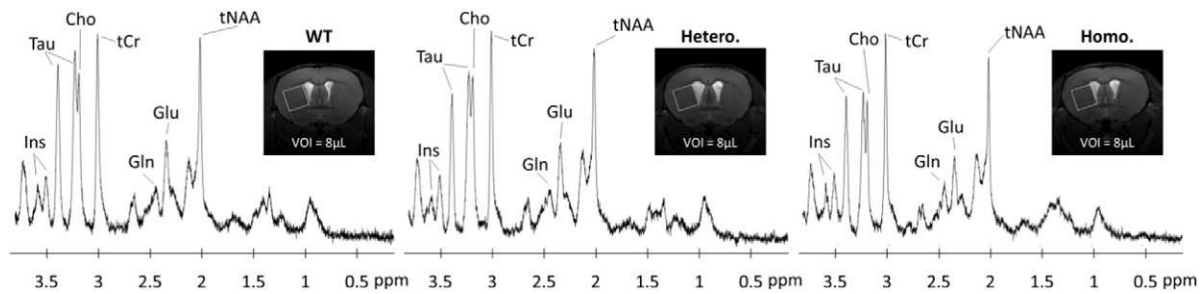


Fig. 3. ^1H MRS of WT littermate and Ki140CAG mice. Examples of ^1H -spectrum acquired in a voxel of $8\ \mu\text{L}$ located in the left striatum of one mouse of each group (WT littermate control mouse: left panel; heterozygous mouse: middle panel; homozygous mouse: right panel). Inset: coronal image centered on mouse striatum with the VOI delimited by the white box. The following metabolites, total choline (tCho), total creatine (tCr), glutamate (Glu), glutamine (Gln), myo-inositol (Ins), total N-acetyl-aspartate + N-acetyl-aspartyl-glutamate (tNAA) and taurine (Tau), were reliably quantified (CRLB <5%).

it did not reach statistical significance for heterozygous mice. Surprisingly, the most affected structure in both heterozygous and homozygous mice was the corpus callosum (-21.8% ($p\text{-value} = 0.033$) and -28.4% ($p\text{-value} = 0.030$) respectively). Interestingly, variations of gluCEST contrasts were consistent between both hemispheres, strongly supporting the idea that measured structure-dependent changes were not related to random inter-regional changes due to an inaccuracy of measurements, but to actual glutamate alterations between brain regions.

Discussion

Behavioral and histological characterization of Ki140CAG mice

In this study, we used a knock-in mouse model of HD which provides a genetically accurate reproduction of the human pathology. This genetic model of HD has already been characterized by slow progression of symptoms as deficits in locomotor performances, behavioral, cellular and molecular abnormalities and neurodegeneration (Menalled et al., 2003).

The behavioral results obtained in the present study showed that both heterozygous and homozygous adult mice exhibited poorer performances than WT littermates. Analysis also showed that homozygous mice seemed to be more affected than heterozygous HD mice in the open-field test. These results suggested that the severity of behavioral signs is stronger in homozygous than in heterozygous

mice, even if difference between heterozygous and homozygous mice did not reach statistical significance because of the small size of mice cohorts. In the rotarod test, both heterozygous and homozygous mice showed poorer performance than WT littermate controls. In this case, homozygous and heterozygous mice appeared similarly affected when comparing the “time to fall” readout. Thus, the notion that homozygous mice are “behaviorally” more affected than heterozygous depends on the test considered. Further characterization and larger animal cohorts are required to fully address this question. However, the qualitative histological evaluation with the EM48 antibody that recognizes huntingtin-positive aggregates showed that homozygous mice had more inclusions than heterozygous mice, supporting the hypothesis that homozygous mice are more affected from a molecular point of view. This is consistent with our recent observations that reduction in the expression of striatal markers (e.g. DARPP-32, Crm, Abdh11os) is more pronounced in homozygous Ki140CAG mice than in heterozygous (Francelle et al., 2015a,b). The present MRS and MRI data support this view, even though we examined relatively small groups of WT littermates and Ki140CAG mice.

Assessing HD in mice using traditional markers

We measured striatum volume of each mouse using manual segmentation of the brain on anatomical images. These morphometric measures demonstrated atrophy of the striatum in both groups of HD mice. Moreover, the decrease of striatal volume of homozygous mice was two times higher than in heterozygous mice compared to their WT littermates. At 12 months of age, striatal volume appears to be correlated with disease severity, as confirmed by behavioral and histological characterization. This is the first time that a significant atrophy of the striatum is detected by MRI in Ki140CAG mice. This model has been examined by quantitative histological evaluation (stereological cell counts) and no cell loss has been found in the striatum at 12 month of age (Menalled et al., 2003). Our results further support the view that striatal atrophy, even if limited, can occur relatively early. This is consistent with previous studies where striatal volume was shown to be a prodromal marker of HD changes in both HD gene carriers and other animal models and atrophy correlated with severity of symptoms (Myers et al., 1988; Tabrizi et al., 2013). However, even if striatal volume provides interesting clues about structure alterations at macroscopic scale, physiological pathways underlying this striatal alteration remain unknown. For this reason, we searched for more functional alterations, possibly related to defects in energy metabolism and/or neurotransmission using gluCEST imaging.

Metabolic alterations detected by ^1H MRS

From the perspective of identifying relevant and early biological markers of the disease, MRS is promising as it can provide valuable biological information occurring in vivo at cellular level (Zacharoff et al.,

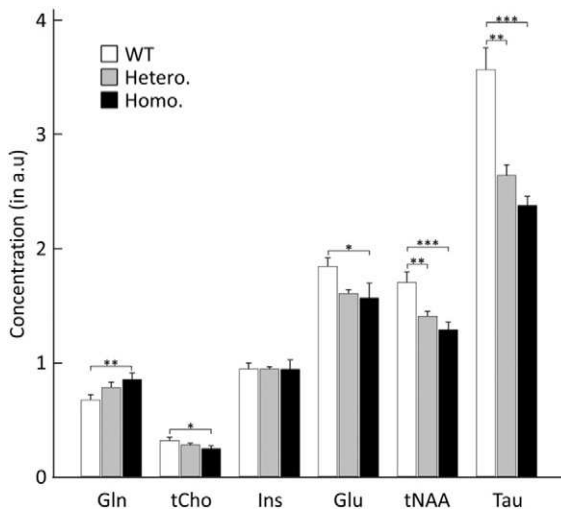


Fig. 4. Metabolic profiles measured by MRS. Concentration of metabolites normalized with respect to 8 mM tCr measured in left striatum of WT littermate controls, heterozygous and homozygous mice (white, gray and black bars respectively, mean $\pm$ SEM, $n = 5$ for each group). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA (significant threshold set to 0.05) with Fisher's LSD post-hoc test (** $p < 0.001$; * $p < 0.01$; $p < 0.05$).

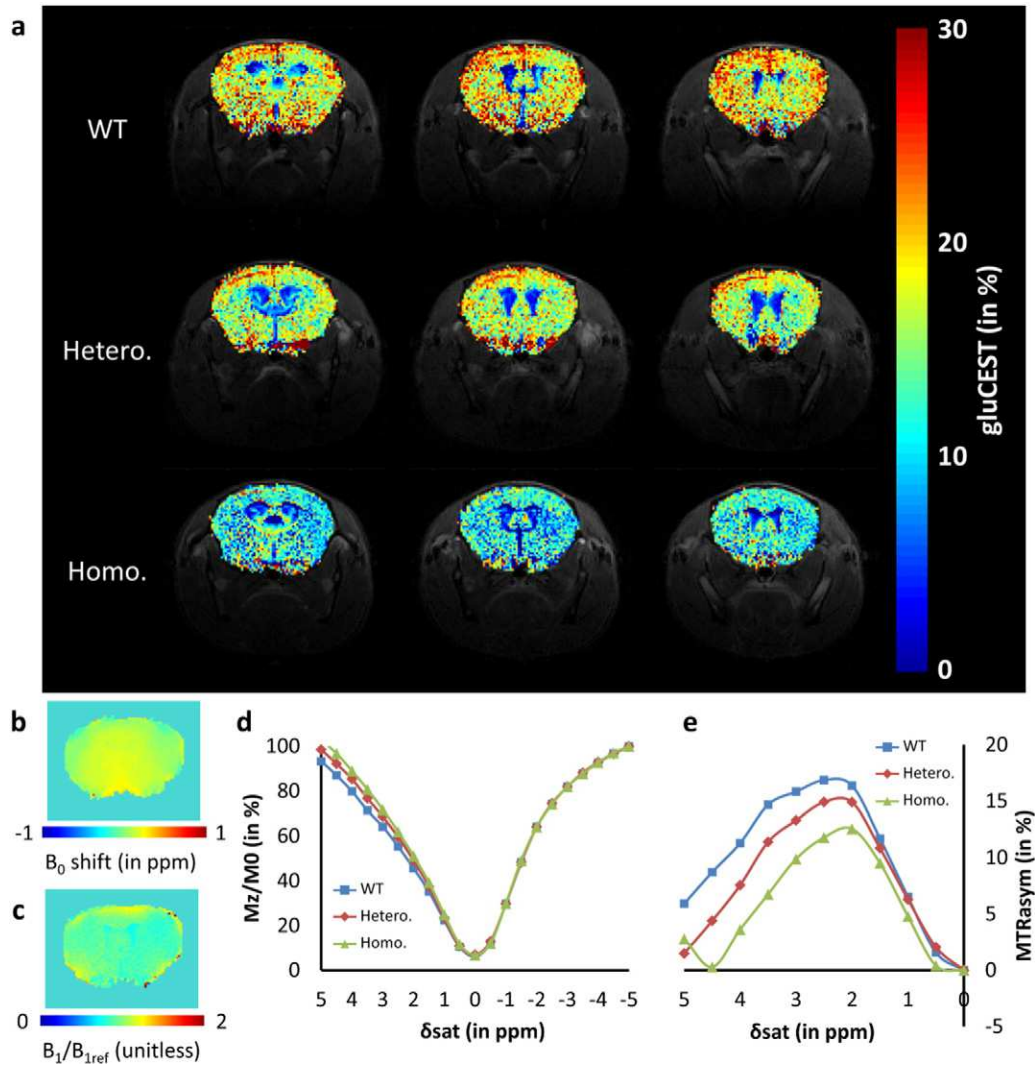


Fig. 5. GluCEST imaging. a) Example of gluCEST images acquired at 3 ppm at three slice positions in each mouse groups (WT littermate control mouse: top panel images; heterozygous mouse: middle panel images; homozygous mouse: bottom panel images). b) Representative B_0 map. c) Representative relative B_1 map. d) Corresponding z-spectra acquired in the striatum of WT littermate, heterozygous and homozygous mice (blue, red and green lines respectively). e) Corresponding MTRRasym spectra acquired in the striatum of WT littermate, heterozygous and homozygous mice (blue, red and green lines respectively).

2012). Here, we evidenced that metabolic profiles measured in striatum were significantly different between each group of mice. Notably, we measured a decrease in [Glu], [tNAA] and [Tau] and an increase in [Gln]. The role of Tau in brain metabolism is not well known but several functions have been proposed such as neurotransmission, osmoregulation or neuroprotection (Foos and Wu, 2002; Law, 1998; Tadros et al., 2005). Caution should be taken to interpret the decrease in [Tau] observed in our study but it may reflect a potential alteration of such regulatory processes in the brain of HD mice. Besides, it is usually assumed that Glu and tNAA are essentially located in the neuronal compartment and can be considered as good neuronal markers (Gill et al., 1989; Petroff et al., 1993; Simmons et al., 1991). The decrease of these metabolites suggests alteration of the integrity of neurons and potentially their functions. Indeed, mapping of tNAA distribution using Chemical Shift Imaging (CSI) in the brain of a quinolinic acid rat model revealed regions where tNAA levels recovered, suggesting tNAA as a potential marker of neuronal dysfunction (Shemesh et al., 2010). It has also been shown that decreased tNAA levels may reflect energy production deficit due to mitochondrial impairments (Tabrizi et al., 2000). Indeed, we showed that in non-human primate and rodent models where both the respiratory chain and TCA cycle was partially blocked by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, brain NAA

levels assessed by MRS were found decreased in absence of neuronal loss, and returned to control levels when the administration of the neurotoxin was stopped (Dautry et al., 2000).

In our study, the decrease in [Glu] was only significant in heterozygous mice group. In homozygous mice group, one can also observe a clear tendency to [Glu] decrease but the measurement variability and the small size of the cohort prevented from reaching statistical significance ($p = 0.061$). Nonetheless, in spite of non-significant decrease of [Glu] in homozygous mice, the tendency of Glu to decrease argues in favor of its potential involvement in the disease. Modifications in glutamate concentrations could also be indicative of metabolic adaptation and/or defects. Indeed, glutamate is in equilibrium with alpha-ketoglutarate, and is thus directly linked to the Krebs cycle. Krebs cycle defects can lead to brain [Glu] changes, as shown in non-human primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3NP (Dautry et al., 1999, 2000). Concomitantly, we measured an increase in [Gln] which is considered to be mainly located in astrocytic cells (Brand et al., 1993). This may reflect a slight inflammation in the brain of HD animals. Such alterations of metabolic profile, with decreased neuronal and increased astrocytic metabolites, are often observed in neurodegenerative diseases. It could suggest an astrocyte/neuron imbalance in energy substrate use and may be indicative of a disturbance

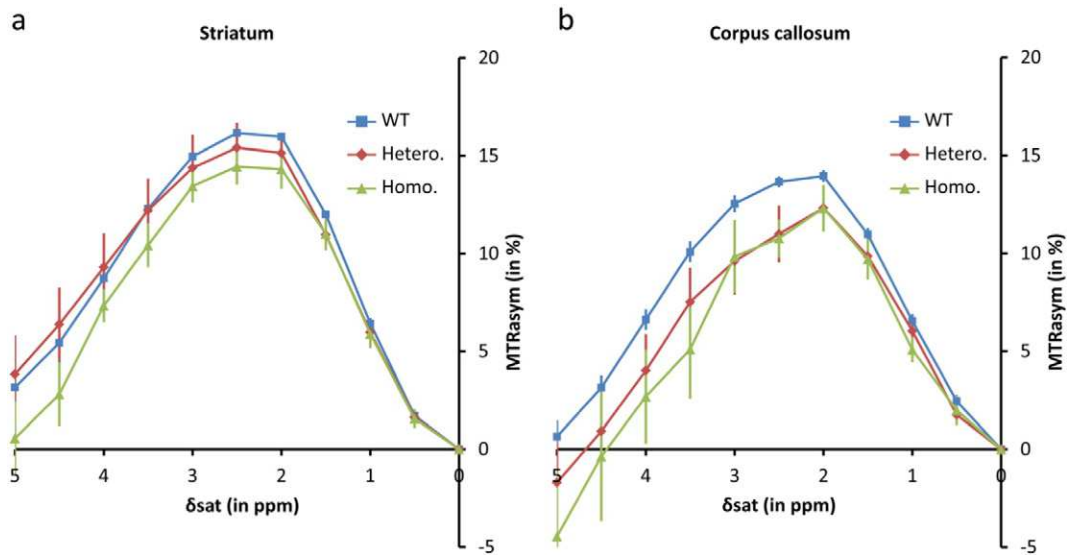


Fig. 6. Comparison of MTRasym measured in striatum and corpus callosum. a) MTRasym spectra acquired in the striatum of WT littermates, heterozygous and homozygous mice (blue, red and green lines respectively). b) MTRasym spectra acquired in the corpus callosum of WT littermates, heterozygous and homozygous mice (blue, red and green lines respectively). Mean values are reported in mean $\pm$ SEM format with $n = 5$ for each group.

of the glutamate/glutamine cycle, which has a central role in energy homeostasis between astrocytes and neurons (Choi et al., 2007).

Previous MRS studies have already been performed on several transgenic mouse models of HD. The transgenic R6/2 mouse is considered as a severe HD model which mimics juvenile onset of HD (Tkac et al., 2012). On the contrary, the knock-in Q111 model is a more

progressive model and reproduces more closely the progression of the disease in HD patients (Menalled et al., 2009). This latter model is closer to our Ki140CAG model which has a late onset of symptom and is slowly progressive. Interestingly, all studies (including ours) showed an increase in Gln and a decrease in tNAA (Jenkins et al., 2000; Tkac et al., 2007), excepted in Q111 where tNAA seemed to remain unchanged

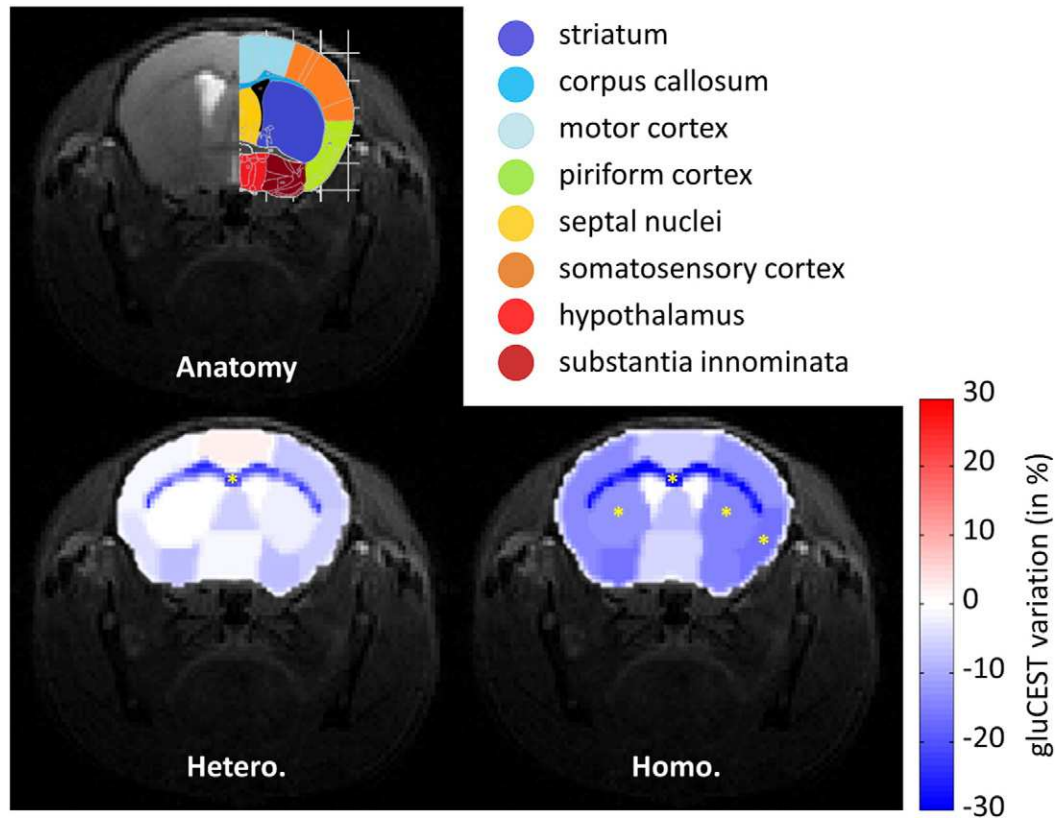


Fig. 7. Variation maps of gluCEST contrasts in Ki140CAG mice. Mice brain was segmented in 8 ROIs (top panel). Variation of gluCEST contrast was calculated in each ROI between WT littermate controls and Ki140CAG mice as follows: Variation = $100 \times (\text{MTRasym}(\text{WT}) - \text{MTRasym}(\text{Ki140CAG})) / \text{MTRasym}(\text{WT})$. MTRasym(Ki140CAG) was either mean gluCEST contrast measured in heterozygous mice (bottom left) or in homozygous mice (bottom right). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA (significant threshold set to 0.05) with Fisher's LSD post-hoc test (* $p < 0.05$).

Table 1

Variations of gluCEST contrasts. Variations were calculated between WT littermate controls and heterozygous mice (left column), between WT littermate controls and homozygous mice (middle column) and between WT₁ littermate controls and WT₂ littermate controls (right column). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA (significant threshold set to 0.05) with Fisher's LSD post-hoc test.

	WT vs. Hetero.		WT vs. Homo.		WT ₁ vs. WT ₂	
	gluCEST variation (in %)	p-Value	gluCEST variation (in %)	p-Value	gluCEST variation (in %)	p-Value
Left striatum	−0.3	0.970	−10.7	0.040	2.0	0.779
Right striatum	−4.3	0.689	−12.7	0.056	2.7	0.592
Corpus callosum	−21.8	0.033	−28.4	0.030	−1.0	0.879
Septal nuclei	−4.8	0.676	−7.0	0.414	−3.6	0.503
Motor cortex	1.6	0.884	−4.7	0.468	1.8	0.845
Left piriform cortex	−3.4	0.721	−11.0	0.078	−2.1	0.665
Right piriform cortex	−5.6	0.572	−14.0	0.015	−1.5	0.725
Left somatosensory cortex	1.5	0.888	−11.1	0.198	0.0	0.996
Right somatosensory cortex	−6.5	0.565	−10.3	0.329	0.3	0.973
Left substantia innominata	−7.5	0.446	−14.2	0.141	−3.6	0.539
Right substantia innominata	−6.7	0.502	−12.0	0.174	0.0	0.997
Hypothalamus	−1.0	0.912	−4.3	0.460	4.0	0.363

(Tkac et al., 2012). The constant tNAA level in Q111 mice can be explained by their relatively young age of scanned mice (13 weeks), whereas symptoms onset appears at 100 weeks or more (Menalled et al., 2009). Consistent decreases in [Glu] and [Tau] were also reported in Q111 mice (Tkac et al., 2012) and in [Glu] in R6/2 mice (Jenkins et al., 2000, 2005).

Glutamate imaging

Changes in brain metabolites observed in HD patients and animal models using MRS provide key insights about disease progression. However, most MRS studies are focused on a specific brain region which is supposed to be early affected in the disease. In the case of HD, a wide majority of studies, including MRS or morphological changes, were performed in the striatum. Nonetheless, recent studies have shown that other brain regions such as the cortex or the corpus callosum were also altered in HD and sometimes earlier than the striatum (Zacharoff et al., 2012). GluCEST imaging offers the possibility to map spatial distribution of Glu in the brain with a good spatial resolution, without a priori knowledge about the structures exhibiting most important metabolic alterations. In this study, gluCEST images were acquired with excellent anatomical resolution, allowing the accurate delineation of several brain regions. While MRS requires rectangular voxel, leading most of the time to partial volume effects, contamination from surrounding structures was limited in gluCEST. The main advantage of gluCEST imaging over MRS is highlighted in the variation maps of glutamate levels calculated between WT littermates and heterozygous mice and between WT littermates and homozygous mice.

To more specifically assess the reproducibility and precision of the gluCEST measurement, we scanned eight additional WT mice, which were randomly divided into two groups (WT₁ and WT₂). The variation map of gluCEST contrasts calculated between WT₁ and WT₂ exhibited small and non-significant variations of gluCEST contrast (Fig. 8). Only small variations of gluCEST contrast can be observed in some brain structures (Table 1, right column) and were most likely due to noise level in gluCEST images. The strongest decrease was measured in the septal nuclei (−3.6% (p -value = 0.503)) whereas the strongest increase was observed in the hypothalamus (+4.0% (p -value = 0.363)), but no gluCEST variation was significant. Hence, one can estimate that a $\pm 4\%$ variation of gluCEST contrast corresponds to the detection threshold of our method under the current experimental conditions. This is much smaller than the significant variations of gluCEST contrast observed in HD mice, strongly reinforcing the validity of our results.

GluCEST contrast measured in HD mice was lower than in their control littermates in almost all brain structures. As gluCEST contrast is almost proportional to glutamate concentration at physiological concentrations (Cai et al., 2012), it is safe to say that glutamate

concentration was decreased in HD mice. Moreover, glutamate loss was more pronounced in homozygous as compared to heterozygous, which is consistent with a faster progression of the disease in this latter group. If striatum exhibited a decrease of glutamate concentration in HD mice, and particularly a significant decrease in homozygous mice (−10.7% (p = 0.040) and −12.7% (p = 0.056) for left and right striatum respectively), obvious variations were also measured in other brain structures. The most striking result was the strong decrease of gluCEST contrast in the corpus callosum observed in both heterozygous and homozygous mice as compared to WT littermates (−21.8% (p = 0.033) and −28.4% (p = 0.030) respectively). Although corpus callosum is not the most studied structure in the context of HD, some previous studies have already demonstrated that this structure could be altered. For instance, decrease of corpus callosum volume was observed in two different mouse models (Lerch et al., 2008; Lerner et al., 2012). Alterations of corpus callosum were also observed in HD patients, notably using diffusion tensor imaging (DTI) (Rosas et al., 2006, 2010; Weaver et al., 2009). These studies have demonstrated that white matter in pre- and early symptomatic HD patients was affected. They demonstrated that changes in diffusion parameters such as fractional anisotropy (FA) and radial diffusivity (RD) were observed in both pre-manifest and HD patients, whereas morphological changes of corpus callosum occurred only in HD patients (Rosas et al., 2010). Moreover, changes in diffusion parameters were detectable several years before changes in corpus callosum thickness, suggesting that alteration

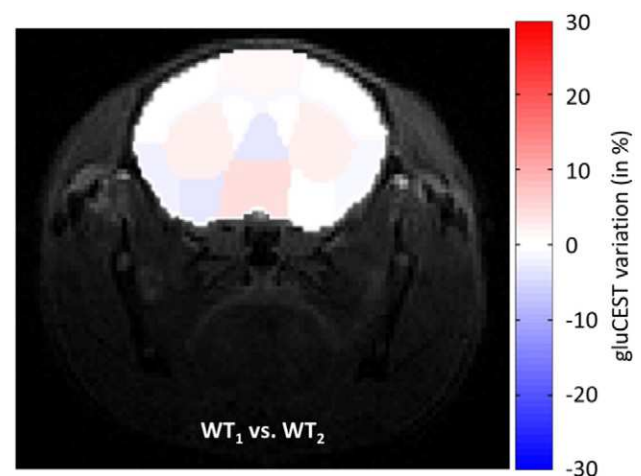


Fig. 8. Variation map of gluCEST contrasts in WT littermate controls. Variation of gluCEST contrasts was measured in 8 ROIs between two groups of WT littermate controls (n = 4 in each group).

of structure and functions of afferent axons/myelination occurred before neuronal death. The origin of topographical alteration of corpus callosum was attributed to degeneration of particular cortical regions. Indeed, corpus callosum is mainly composed by fibers connecting left and right hemispheres with axons projecting contra-laterally into the cortex. In the present study, we demonstrated that corpus callosum was the structure exhibiting the largest gluCEST variations in both HD mice groups, indicating that the metabolic pool of glutamate was decreased in those mice. Not expected at first, such alterations of metabolic pool of glutamate could reflect early changes in brain energy metabolism and early compensatory mechanisms to maintain homeostasis, and/or neuronal death. This finding seems consistent with previous studies suggesting a preferential vulnerability of corpus callosum in the context of HD. This may also encourage carrying further studies in order to precisely evaluate its alteration in other neurodegenerative diseases (Teipel et al., 2002; Wiltshire et al., 2005).

We also noticed a decrease of gluCEST contrast in most cortex regions, especially in homozygous mice, but not as significant as in corpus callosum. The larger decrease observed in the corpus callosum might be explained by the fact that corpus callosum is a well-organized and homogeneous structure. So, one can imagine that, if some neurons were altered or suffering, their fraction in a given voxel would be proportionally more important in the corpus callosum compared to a voxel in a structure containing many cell types such as the striatum or the cortex. However, pronounced decreases were observed in homozygous mice in substantia innominata and piriform cortex. The decrease was even more pronounced in this latter structure than in the striatum. Interestingly, several previous studies performed on different mouse models of HD demonstrated that neuronal plasticity was dramatically altered in brain regions involved in olfactory tasks such as piriform cortex (Lazic et al., 2007; van der Borght and Brundin, 2007). Moreover, pioneer work performed on Ki140CAG model demonstrated that htt protein aggregation was also important in the piriform cortex (Menalled et al., 2003), suggesting potential olfactory impairments in those mice. Such deficits in olfaction and especially in odors discrimination were observed in HD patients, even at early stage of the disease (Lazic et al., 2007; Moberg et al., 1987). Our findings seem to corroborate that piriform cortex could be altered in this Ki140CAG mouse model.

In the present study, we explored the potential of CEST imaging to acquire glutamate distribution maps with a good spatial resolution. Similarly to MRS, this is the metabolic pool of glutamate which is probed using gluCEST imaging. However, both techniques are not strictly similar and should be compared with caution. First, comparison between MRS and gluCEST is difficult to perform in strictly identical regions of interest, because signal localization and spatial resolutions are very different in both cases. Furthermore, MRS offers a quantitative “direct” detection of several metabolites whereas gluCEST is able to detect glutamate through magnetization transfer between $-NH_2$ protons and free water protons. Several phenomena, such as magnetic transfer asymmetry or contribution of other exchanging protons from creatine or gamma-aminobutyric acid, may compete with gluCEST contrast and have a minor contribution to the gluCEST contrast (Cai et al., 2012). Such undesirable effects can partially explain small differences between our MRS and gluCEST results and further work will be needed in order to precisely determine potential competing effects in this mouse model. Nonetheless, gluCEST imaging remains a suitable technique to map glutamate alteration levels at high resolution with few contaminations of surrounding structures. Acquisition of a reliable spectrum using MRS in small structures such as the corpus callosum would be much more challenging. Chemical Shift Imaging, which offers an alternative to map metabolic alterations in vivo, has also been proposed to study HD rat models (Beal et al., 1993; Shemesh et al., 2010). However, if the voxel size (a few μL) permitted by CSI was enough to study these models with large excitotoxic lesions in rats, such resolution would have been too large to detect subtle alterations in small brain structures,

especially in mice. Therefore, the partial volume effect in gluCEST imaging is much smaller than in MRS or CSI, giving probably more reliable results in thin structures such as the corpus callosum. Of course, partial volume effects below pixel resolution cannot be excluded, but this is a general problem in imaging. However, since all structures surrounding the corpus callosum appear to be less affected than the corpus callosum itself (including potential partial volume effects), we must conclude that partial volume effects can only result in an underestimation of the gluCEST variation in the corpus callosum. In that context, the conclusions of the paper remain unchanged: the corpus callosum is indeed the most affected structure, but the actual drop of gluCEST effect in pure corpus callosum (far from the edge, excluding all potential partial volume effects) may actually be slightly stronger than reported.

Recent studies have demonstrated the feasibility of gluCEST imaging in healthy human brain and spinal cord (Cai et al., 2012, 2013; Kogan et al., 2013) and also in patients with temporal lobe epilepsy (Davis et al., 2015) at 7 T. In spite of SAR deposition limitations required for safe human imaging and hardware restrictions of clinical scanner, these studies showed the potential of gluCEST imaging to map with a good resolution the actual glutamate distribution in brain and spinal cord. The fast exchange regime of $-NH_2$ protons requires high magnetic fields (≥ 7 T), but the increasing availability of clinical 7 T scanners may open the possibility to evaluate gluCEST imaging to monitor human HD patients.

Conclusion

In this study, we used a knock-in mouse model of Huntington's disease (Ki140CAG) in order to evaluate the interest of gluCEST imaging as a relevant biomarker of HD. We demonstrated that gluCEST contrast was decreased in most of brain regions in homozygous mice as compared to their control littermates. The decrease was smaller in heterozygous mice brain which was consistent with a slower progression of the disease in those mice. Atrophy and MRS-detected metabolic content of the striatum also displayed the same trend. All results indicated modification of metabolism in the brain of HD animal which might be due to metabolic adaptation and/or defects. Interestingly, the good spatial resolution offered by gluCEST imaging allowed identification of region-specific alterations. The corpus callosum seemed to be the most affected brain structure in this mouse model, as largest gluCEST contrast variations were measured in this region in both HD cohorts. This result emphasizes the potential of gluCEST imaging for characterizing metabolic defects in neurodegenerative diseases in specific brain regions. As gluCEST method has already been successfully implemented on high-field clinical scanners (Cai et al., 2013), its evaluation in both pre-manifest and HD patients would be of high interest in order to better understand the physiopathological pathways involving glutamate in HD.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Zeitlin, Dr. M. Levine and Dr. Humbert for their help in getting the breeders for starting our Ki140CAG mouse colony. We are grateful J. Mitja for taking care of the animal and helping with behavioral studies. This work was supported by a grant from Agence Nationale pour la Recherche (“HDeNERGY” project, ANR-14-15CE-0007-01). The 11.7 T MRI scanner was funded by a grant from NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (“Investissements d’Avenir”, ANR-11-INBS-0011).

References

- Aylward, E.H., Sparks, B.F., Field, K.M., Yallapragada, V., Shpritz, B.D., Rosenblatt, A., Brandt, J., Gourley, L.M., Liang, K., Zhou, H., Margolis, R.L., Ross, C.A., 2004. Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63, 66–72.
- Beal, M.F., 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58, 495–505.

- Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Miller, J.M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B.R., Hyman, B.T., 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13, 4181–4192.
- Bossy, B., Perkins, G., Bossy-Wetzel, E., 2008. Clearing the brain's cobwebs: the role of autophagy in neuroprotection. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 97–101.
- Boussicault, L., Herard, A.S., Calingasan, N., Petit, F., Malgorn, C., Merienne, N., Jan, C., Gaillard, M.C., Lerchundi, R., Barros, L.F., Escartin, C., Delzescaux, T., Mariani, J., Hantraye, P., Flint Beal, M., Brouillet, E., Vega, C., Bonvento, G., 2014. Impaired brain energy metabolism in the BACHD mouse model of Huntington's disease: critical role of astrocyte-neuron interactions. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1500–1510.
- Brand, A., Richter-Landsberg, C., Leibfritz, D., 1993. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev. Neurosci.* 15, 289–298.
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., Hantraye, P., 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59, 427–468.
- Cai, K., Haris, M., Singh, A., Kogan, F., Greenberg, J.H., Hariharan, H., Detre, J.A., Reddy, R., 2012. Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat. Med.* 18, 302–306.
- Cai, K., Singh, A., Roalf, D.R., Nanga, R.P., Haris, M., Hariharan, H., Gur, R., Reddy, R., 2013. Mapping glutamate in subcortical brain structures using high-resolution GluCEST MRI. *NMR Biomed.* 26, 1278–1284.
- Carrillo-de Sauvage, M.A., Flament, J., Bramouille, Y., Ben Haim, L., Guillermier, M., Bernard, A., Auregan, G., Houitte, D., Brouillet, E., Bonvento, G., Hantraye, P., Valette, J., Escartin, C., 2015. The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an in vivo multimodal magnetic resonance imaging study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 917–921.
- Choi, J.K., Dedeoglu, A., Jenkins, B.G., 2007. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR Biomed.* 20, 216–237.
- Cowan, C.M., Raymond, L.A., 2006. Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 25–71.
- Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N., Brouillet, E., 2010. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 52–61.
- Dautry, C., Conde, F., Brouillet, E., Mittoux, V., Beal, M.F., Bloch, G., Hantraye, P., 1999. Serial ¹H NMR spectroscopy study of metabolic impairment in primates chronically treated with the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. *Neurobiol. Dis.* 6, 259–268.
- Dautry, C., Vaufrey, F., Brouillet, E., Bizat, N., Henry, P.G., Conde, F., Bloch, G., Hantraye, P., 2000. Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 789–799.
- Davis, K.A., Nanga, R.P., Das, S., Chen, S.H., Hadar, P.N., Pollard, J.R., Lucas, T.H., Shinohara, R.T., Litt, B., Hariharan, H., Elliott, M.A., Detre, J.A., Reddy, R., 2015. Glutamate imaging (GluCEST) lateralizes epileptic foci in nonlesional temporal lobe epilepsy. *Sci. Transl. Med.* 7, 309ra161.
- Foos, T.M., Wu, J.Y., 2002. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem. Res.* 27, 21–26.
- Francelle, L., Galvan, L., Gaillard, M.C., Guillermier, M., Houitte, D., Bonvento, G., Petit, F., Jan, C., Dufour, N., Hantraye, P., Elalouf, J.M., De Chaldee, M., Deglon, N., Brouillet, E., 2015a. Loss of the thyroid hormone-binding protein Crym renders striatal neurons more vulnerable to mutant huntingtin in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1563–1573.
- Francelle, L., Galvan, L., Gaillard, M.C., Petit, F., Bernay, B., Guillermier, M., Bonvento, G., Dufour, N., Elalouf, J.M., Hantraye, P., Deglon, N., de Chaldee, M., Brouillet, E., 2015b. Striatal long noncoding RNA Abhd11os is neuroprotective against an N-terminal fragment of mutant huntingtin in vivo. *Neurobiol. Aging* 36 (1601), e1607–e1616.
- Gill, S.S., Small, R.K., Thomas, D.G., Patel, P., Porteous, R., Van Bruggen, N., Gadian, D.G., Kauppinen, R.A., Williams, S.R., 1989. Brain metabolites as ¹H NMR markers of neuronal and glial disorders. *NMR Biomed.* 2, 196–200.
- Harper, P.S., 1991. Huntington's Disease.
- Hobbs, N.Z., Barnes, J., Frost, C., Henley, S.M., Wild, E.J., Macdonald, K., Barker, R.A., Scallan, R.I., Fox, N.C., Tabrizi, S.J., 2010. Onset and progression of pathologic atrophy in Huntington disease: a longitudinal MRI imaging study. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 31, 1036–1041.
- Jenkins, B.G., Rosas, H.D., Chen, Y.C., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M., Rosen, B.R., Beal, M.F., Koroshetz, W.J., 1998. ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 50, 1357–1365.
- 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. *J. Neurochem.* 74, 2108–2119.
- Jenkins, B.G., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Leavitt, B., Hayden, M., Borchelt, D., Ross, C.A., Ferrante, R.J., 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. *J. Neurochem.* 95, 553–562.
- Kim, M., Gillen, J., Landman, B., Zhou, J., van Zijl, P., 2009. Water Saturation Shift Referencing (WASSR) for Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) Experiments. *Magn. Reson. Med.* 61, 1441–1450.
- Kogan, F., Singh, A., Debrosse, C., Haris, M., Cai, K., Nanga, R.P., Elliott, M., Hariharan, H., Reddy, R., 2013. Imaging of glutamate in the spinal cord using GluCEST. *NeuroImage* 77, 262–267.
- Kuwert, T., Lange, H.W., Langen, K.J., Herzog, H., Aulich, A., Feinendegen, L.E., 1989. Cerebral glucose consumption measured by PET in patients with and without psychiatric symptoms of Huntington's disease. *Psychiatry Res.* 29, 361–362.
- Kuwert, T., Lange, H.W., Langen, K.J., Herzog, H., Aulich, A., Feinendegen, L.E., 1990. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 113 (Pt 5), 1405–1423.
- Law, R.O., 1998. The role of taurine in the regulation of brain cell volume in chronically hyponatraemic rats. *Neurochem. Int.* 33, 467–472.
- Lazic, S.E., Goodman, A.O., Grote, H.E., Blakemore, C., Morton, A.J., Hannan, A.J., van Dellen, A., Barker, R.A., 2007. Olfactory abnormalities in Huntington's disease: decreased plasticity in the primary olfactory cortex of R6/1 transgenic mice and reduced olfactory discrimination in patients. *Brain Res.* 1151, 219–226.
- Lerch, J.P., Carroll, J.B., Spring, S., Bertram, L.N., Schwab, C., Hayden, M.R., Henkelman, R.M., 2008. Automated deformation analysis in the YAC128 Huntington disease mouse model. *NeuroImage* 39, 32–39.
- Lerner, R.P., Trejo Martinez Ldel, C., Zhu, C., Chesselet, M.F., Hickey, M.A., 2012. Striatal atrophy and dendritic alterations in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Res. Bull.* 87, 571–578.
- Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., Detloff, P.J., 2001. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 137–144.
- Liu, G., Gilad, A.A., Bulte, J.W., van Zijl, P.C., McMahon, M.T., 2010. High-throughput screening of chemical exchange saturation transfer MR contrast agents. *Contrast Media Mol. Imaging* 5, 162–170.
- Magistretti, P.J., Allaman, I., 2015. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86, 883–901.
- Menalled, L.B., 2005. Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* 2, 465–470.
- Menalled, L.B., Chesselet, M.F., 2002. Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 32–39.
- Menalled, L.B., Sison, J.D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., Chesselet, M.F., 2003. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J. Comp. Neurol.* 465, 11–26.
- Menalled, L., El-Khodori, B.F., Patry, M., Suarez-Farinas, M., Orenstein, S.J., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X.W., MacDonald, M., Morton, A.J., Bates, G., Leeds, J., Park, L., Howland, D., Signer, E., Tobin, A., Brunner, D., 2009. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol. Dis.* 35, 319–336.
- Moberg, P.J., Pearson, G.D., Speedie, L.J., Lipsey, J.R., Strauss, M.E., Folstein, S.E., 1987. Olfactory recognition: differential impairments in early and late Huntington's and Alzheimer's diseases. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 9, 650–664.
- Mochel, F., Haller, R.G., 2011. Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J. Clin. Invest.* 121, 493–499.
- Mochel, F., Charles, P., Seguin, F., Barriault, J., Coussieu, C., Perin, L., Le Bouc, Y., Gervais, C., Carcelain, G., Vassault, A., Feingold, J., Rabier, D., Durr, A., 2007. Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One* 2, e647.
- Mochel, F., Durant, B., Meng, X., O'Callaghan, J., Yu, H., Brouillet, E., Wheeler, V.C., Humbert, S., Schiffmann, R., Durr, A., 2012. Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. *J. Biol. Chem.* 287, 1361–1370.
- Myers, R.H., Vonsattel, J.P., Stevens, T.J., Cupples, L.A., Richardson, E.P., Martin, J.B., Bird, E.D., 1988. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38, 341–347.
- Paulsen, J.S., Langbehn, D.R., Stout, J.C., Aylward, E., Ross, C.A., Nance, M., Guttman, M., Johnson, S., MacDonald, M., Beglinger, L.J., Duff, K., Kayson, E., Biglan, K., Shoulson, I., Oakes, D., Hayden, M., Predict, H.D.I., Coordinators of the Huntington Study, G., 2008. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 874–880.
- Petroff, O.A., Pleban, L., Prichard, J.W., 1993. Metabolic assessment of a neuron-enriched fraction of rat cerebrum using high-resolution ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 30, 559–567.
- Provencher, S.W., 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 30, 672–679.
- Rocher, A.B., Gubellini, P., Merienne, N., Boussicault, L., Petit, F., Gipchtein, P., Jan, C., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., 2016. Synaptic scaling up in medium spiny neurons of aged BACHD mice: a slow-progression model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 86, 131–139.
- Rosas, H.D., Tuch, D.S., Hevelone, N.D., Zaleta, A.K., Vangel, M., Hersch, S.M., Salat, D.H., 2006. Diffusion tensor imaging in presymptomatic and early Huntington's disease: selective white matter pathology and its relationship to clinical measures. *Mov. Disord.* 21, 1317–1325.
- Rosas, H.D., Lee, S.Y., Bender, A.C., Zaleta, A.K., Vangel, M., Yu, P., Fischl, B., Pappu, V., Onorato, C., Cha, J.H., Salat, D.H., Hersch, S.M., 2010. Altered white matter microstructure in the corpus callosum in Huntington's disease: implications for cortical "disconnection". *NeuroImage* 49, 2995–3004.
- Sawiak, S.J., Wood, N.L., Williams, G.B., Morton, A.J., Carpenter, T.A., 2009. Use of magnetic resonance imaging for anatomical phenotyping of the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 33, 12–19.
- Shemesh, N., Sadan, O., Melamed, E., Offen, D., Cohen, Y., 2010. Longitudinal MRI and MRSI characterization of the quinolinic acid rat model for excitotoxicity: peculiar apparent diffusion coefficients and recovery of N-acetyl aspartate levels. *NMR Biomed.* 23, 196–206.
- Simmons, M.L., Frondoza, C.G., Coyle, J.T., 1991. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience* 45, 37–45.
- Sonnwald, U., 2014. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation — where do all the carbons go? *J. Neurochem.* 131, 399–406.
- Stollberger, R., Wach, P., 1996. Imaging of the active B-1 field in vivo. *Magn. Reson. Med.* 35, 246–251.
- Sturrock, A., Laule, C., Decolongo, J., Dar Santos, R., Coleman, A.J., Creighton, S., Bechtel, N., Reilmann, R., Hayden, M.R., Tabrizi, S.J., Mackay, A.L., Leavitt, B.R., 2010. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in premanifest and early Huntington disease. *Neurology* 75, 1702–1710.

- Sugars, K.L., Rubinsztein, D.C., 2003. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet.* 19, 233–238.
- Sun, P., van Zijl, P., Zhou, J., 2005. Optimization of the irradiation power in chemical exchange dependent saturation transfer experiments. *J. Magn. Reson.* 175, 193–200.
- Tabrizi, S.J., Workman, J., Hart, P.E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J.M., Schapira, A.H., 2000. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann. Neurol.* 47, 80–86.
- Tabrizi, S.J., Scahill, R.I., Owen, G., Durr, A., Leavitt, B.R., Roos, R.A., Borowsky, B., Landwehrmeyer, B., Frost, C., Johnson, H., Craufurd, D., Reilmann, R., Stout, J.C., Langbehn, D.R., Investigators, T.-H., 2013. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol.* 12, 637–649.
- Tadros, M.G., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, A.B., Arafa, H.M., 2005. Neuroprotective effect of taurine in 3-nitropropionic acid-induced experimental animal model of Huntington's disease phenotype. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 574–582.
- Teipel, S.J., Bayer, W., Alexander, G.E., Zebuhr, Y., Teichberg, D., Kulic, L., Schapiro, M.B., Moller, H.J., Rapoport, S.I., Hampel, H., 2002. Progression of corpus callosum atrophy in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 243–248.
- 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 ^1H NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* 100, 1397–1406.
- Tkac, I., Henry, P.G., Zacharoff, L., Wedel, M., Gong, W., Deelchand, D.K., Li, T., Dubinsky, J.M., 2012. Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
- van der Borght, K., Brundin, P., 2007. Reduced expression of PSA-NCAM in the hippocampus and piriform cortex of the R6/1 and R6/2 mouse models of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 204, 473–478.
- van Zijl, P.C., Yadav, N.N., 2011. Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn. Reson. Med.* 65, 927–948.
- Walker, F.O., 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369, 218–228.
- Ward, K.M., Balaban, R.S., 2000. Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn. Reson. Med.* 44, 799–802.
- Ward, K.M., Aletras, A.H., Balaban, R.S., 2000. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J. Magn. Reson.* 143, 79–87.
- Weaver, K.E., Richards, T.L., Liang, O., Laurino, M.Y., Samii, A., Aylward, E.H., 2009. Longitudinal diffusion tensor imaging in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 216, 525–529.
- Wheeler, V.C., White, J.K., Gutekunst, C.A., Vrbanc, V., Weaver, M., Li, X.J., Li, S.H., Yi, H., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Hersch, S., Auerbach, W., Joyner, A.L., MacDonald, M.E., 2000. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9, 503–513.
- Wheeler, V.C., Gutekunst, C.A., Vrbanc, V., Lebel, L.A., Schilling, G., Hersch, S., Friedlander, R.M., Gusella, J.F., Vonsattel, J.P., Borchelt, D.R., MacDonald, M.E., 2002. Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 11, 633–640.
- Wiltshire, K., Foster, S., Kaye, J.A., Small, B.J., Camicioli, R., 2005. Corpus callosum in neurodegenerative diseases: findings in Parkinson's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 20, 345–351.
- Wolff, S., Balaban, R., 1990. NMR imaging of labile proton exchange. *J. Magn. Reson.* 86, 164–169.
- Zacharoff, L., Tkac, I., Song, Q., Tang, C., Bolan, P.J., Mangia, S., Henry, P.G., Li, T., Dubinsky, J.M., 2012. Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 502–514.
- Zhou, J., van Zijl, P.C.M., 2006. Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 48.



Energy defects in Huntington's disease: Why “in vivo” evidence matters



Géraldine Liot ^{a, b}, Julien Valette ^{a, b}, Jérémy Pépin ^{a, b}, Julien Flament ^{a, c},
Emmanuel Brouillet ^{a, b, *}

^a CEA, DRF, I²BM, Molecular Imaging Research Center (MIRcen), F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

^b CEA, CNRS, Paris-Sud University, Paris-Saclay University, UMR9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

^c Institut National de la santé et de la recherche médicale (Inserm), UMS 27, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2016

Accepted 13 September 2016

Available online 14 September 2016

Keywords:

Huntington's disease

NMR

Spectroscopy

Mitochondria

Excitotoxicity

Calcium

Glutamate

NMDA receptors

Energy metabolism

Biomarker

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an inherited progressive neurodegenerative disorder associated with involuntary abnormal movements (chorea), cognitive deficits and psychiatric disturbances. The most striking neuropathological change in HD is the early atrophy of the striatum. While the disease progresses, other brain structures also degenerate, including the cerebral cortex. Changes are also seen outside the brain, in particular weight loss/cachexia despite high dietary intake. The disease is caused by an abnormal expansion of a CAG repeat in the gene encoding the huntingtin protein (Htt). This mutation leads to the expression of a poly-glutamine stretch that changes the biological functions of mutant Htt (mHtt). The mechanisms underlying neurodegeneration in HD are not totally elucidated. Here, we discuss recent results obtained in patients, animal and cellular models suggesting that early disturbance in energy metabolism at least in part associated with mitochondrial defects may play a central role, even though all data are not congruent, possibly because most findings were obtained in cell culture systems or using biochemical analyses of post mortem tissues from rodent models. Thus, we put a particular focus on brain imaging studies that could identify biomarkers of energy defects in vivo and would be of prime interest in preclinical and clinical trials testing the efficacy of new therapies targeting energy metabolism in HD.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1085
2. Huntington's disease	1085
2.1. Description	1085
2.2. Pathogenesis	1085
3. Mitochondrial disorders and mitochondrial toxins suggest preferential vulnerability of the striatum	1086
4. General mechanism of mitochondrial defects in HD patients	1086
4.1. Mitochondrial enzymes and high energy phosphates	1086
4.1.1. Defects in respiratory chain enzymes	1086
4.1.2. Levels of high energy phosphates	1087
4.2. Mitochondrial membrane potential	1087
4.3. Mitochondrial Ca ²⁺ buffering capacity	1087
4.4. Abnormal dynamics and unbalanced fusion/fission mechanisms	1088
4.5. PGC-1 alpha, NRF and PPARγ, PPARδ	1088

* Corresponding author. Neurodegenerative diseases Laboratory, Molecular Imaging Research Center (MIRcen), Bat 61, CEA, 18 route du Panorama, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France.

E-mail address: Emmanuel.brouillet@cea.fr (E. Brouillet).

4.6.	Tim23 and mitochondrial import	1088
4.7.	Mitophagy	1088
5.	Possible integrated mechanisms of mitochondrial dysfunction in HD	1089
6.	In vivo evidence for energy/mitochondrial impairment in HD	1089
6.1.	Pioneering studies using brain imaging methods in patients and animal models	1089
6.2.	Recent imaging studies using brain imaging methods in patients and animal models	1089
6.2.1.	Brain metabolite measurement by ¹ H MRS	1089
6.2.2.	A novel MRI method to establish brain map of glutamate: gluCEST imaging	1090
6.2.3.	³¹ P-MRS for high energy phosphates	1090
6.3.	What MRS could bring to HD patients?	1091
	Acknowledgements	1091
	References	1091

1. Introduction

Mitochondria play central roles in cell survival by controlling energy metabolism, apoptosis pathways and Ca²⁺ homeostasis [1–4]. The hypothesis of a role of mitochondria in Huntington's disease (HD) has been initially substantiated by the observation of biochemical anomalies in the respiratory chain enzymes in mitochondria prepared from the striatum of HD patients. It was also shown that mitochondrial toxins could produce preferential striatal degeneration. Since these pioneering studies in the 80's and early 90's, the mutation responsible for HD has been identified, the gene (HTT) cloned, and many genetic animal models have been studied to decipher the pathogenesis of HD. Since, accumulating evidence indicate that mitochondria are key players in HD pathogenesis [5].

In the first part of the present review, we will provide a brief overview of the mitochondrial defects that are suspected to play a key role in HD, with a focus on the most recent studies. The core of many convincing findings was mostly obtained using genetic models of HD in cells or animals using biochemical, cellular biology and transcriptomic studies. These studies improved our understanding of the “mitochondrial” hypothesis. However, in vivo observations of energy defects in patients or animal models are scarcer. Thus, in a second part, we will review data obtained by non-invasive imaging and spectroscopy methods in the brain. These challenging approaches could improve the follow up of energy metabolism in vivo in the brain of animal models and human HD gene carriers. This would be of major interest in preclinical and clinical trials testing the efficacy of novel therapeutics, especially those targeting the mitochondria.

2. Huntington's disease

2.1. Description

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant inherited neurodegenerative disorder of midlife onset caused by an abnormal expansion of a CAG repeat in the exon 1 of the gene encoding for the Huntingtin protein (Htt) [6]. HD is characterized by involuntary abnormal movements and postures (chorea, dyskinesia, dystonia) [7]. Other symptoms consist of mood, psychiatric disturbances and cognitive deficits characterized by a perseverative behavior and impaired strategy and planification. With the progression of the disease, motor rigidity and dementia predominate. The disease is fatal within 15–20 years after onset. Several cerebral regions show signs of neurodegeneration in HD. However, the most striking neuropathological hallmark of this disorder is the atrophy of the striatum as seen using post mortem histological evaluation [8]. Non-invasive brain magnetic resonance imaging (MRI) [9–12] confirmed severe striatal atrophy in patients with symptoms. MRI

studies in large cohort of mutant HTT gene carriers with no detectable symptoms (i.e. pre-symptomatic or pre-manifest) showed that the caudate and putamen are atrophied even ten years before onset [9–11]. The disease preferentially affects the GABAergic medium size spiny neurons of the striatum that project to substantia nigra reticulata and pallidum whereas large cholinergic interneurons and medium size (aspiny) interneurons are preserved in the HD striatum [13,14]. Cortical atrophy and early degeneration of the hypothalamus are also important aspects of HD pathogenesis, and late stage HD patients show widespread brain degeneration [15].

Many genetic models of HD have been generated in flies, worms and mammals (mice, rats, pigs, sheep, monkeys) [16–18]. Among all these animal models, rodent models are the most commonly studied [19,20]. The R6/2 and R6/1 transgenic mouse models of HD which overexpress human exon 1 of the HD gene have a very strong behavioral phenotype with short life span and has been the most studied model so far. Other transgenic models express the entire mutant human gene under its own promoter (YAC128Q mice, BACHD mice and rats) show a milder and more progressive neurological phenotype with limited/absent neurodegeneration [21]. The mouse models that are genetically the most relevant to HD are the knock-in models where a CAG expansion is inserted in the mouse homologue HD gene (HDh111, HDh140, HDh150, zQ175). Excellent reviews have been released for a comprehensive review of these models, all very different but complementary depending on the research to be conducted [20,22–25].

2.2. Pathogenesis

The mutation induces both a loss of function and a gain of function. Wild type Htt plays an important role in cell survival by controlling apoptosis pathways, regulating intracellular transport machinery, vesicle trafficking and secretion [26–29].

The toxic functions acquired by mutant Htt may involve the full length Htt and the short N-terminus fragments produced by the cleavage performed by different proteases including calpain [30–34] and caspases [35–37]. Other proteases, all of which have not been identified yet play also key roles [38,39]. Compelling evidence has shown that the N-terminus fragments of mutant Htt recapitulate several aspects of the full-length mutant protein's toxicity [40]. In a recently developed transgenic mouse model of HD (bacterial artificial chromosome HD – BACHD) expressing the full length human mutant gene, neuronal dysfunction starts early while the accumulation of N-terminal Htt fragment is minimal [21]. And recently, it has been demonstrated that the C-terminal part of Htt generated by cleavage of the full length mutant Htt is toxic. By binding and inactivating dynamin 1, the C-terminal part of mutant Htt generates endoplasmic reticulum (ER) dilation and cell toxicity

[41]. In addition, the mutation in the HTT gene also leads to toxic mechanisms not produced by expression of mutant Htt (or fragments) but involving (abnormal) sense and antisense non ATG translation of RNA (RAN) of expanded CAG repeats [42].

Abnormal transcription and transcription regulation have been demonstrated [29,43–45]. Mutant Htt alters macromolecular complexes regulating transcription. The mutation produces changes in protein-protein interaction between Htt and transcription factors or co-factors such as CBP, TAF4, CA150, Sp1, and p53 that can produce deleterious downstream events. Intriguingly, expression of neuronal genes, especially striatal-enriched genes is particularly reduced in HD [45,46].

For example, an important consequence of transcriptional changes involves the neurotrophin BDNF (brain neurotrophic factor). Wild type Htt regulates the expression of BDNF by sequestering REST/NRSF in the cytoplasm, avoiding repression of BDNF gene through binding at the RE1/NRSE site located in the BDNF promoter [47]. BDNF is mainly synthesized in the cortical neurons and delivered to the striatum through vesicles using axonal transport [26]. Reduced BDNF levels in the striatum would render medium size spiny neurons highly vulnerable. Early axonal transport dysfunction and alteration of vesicle trafficking have been shown [48]. In particular impaired transport of vesicles containing BDNF along the axon would further reduce the delivery of BDNF to striatal cells [26]. Additionally, the retrograde transport of the BDNF receptor, TrkB. TrkB-containing vesicles within striatal dendrites and the BDNF/TrkB-induced signaling through ERK phosphorylation and c-fos induction are decreased in neurons from an HD mouse model [49]. Impaired axonal transport might also affect organelle, including mitochondria localization (see below). Protein misfolding, proteasome dysfunction [50,51], and reduction of autophagy [52], likely play important roles in HD. Abnormal entry of Ca^{2+} through NMDA receptors and excitotoxicity has been suggested [53,54]. Defective cytosolic Ca^{2+} buffering by mitochondria and ER have been observed [55–57].

There exists a large body of studies focus on the transcriptomic defects in post mortem samples of the striatum and cerebral cortex of HD patients, and genetic rodent models. Additional set of data has been recently provided from the characterization of neurons differentiated from human neural stem cells (hESC) or induced pluripotent stem cells from HD gene carriers (e.g. Ref. [58]). These different dataset point to the variety of the potential consequences of transcriptional defects, and underscore that the associated mechanisms of neuronal dysfunction/neurodegeneration are probably highly complex. Many comprehensive reviews can be read on this aspect of HD pathogenesis.

An integrated RNAseq analysis of transcriptional changes in the striatum, cerebral cortex and cerebellum of different knock-in HD mouse models with increasing CAG repeat length at different ages recently provided a global picture on how several cellular functions are early disturbed in the HD striatum including transcription and chromatin factors, cell death pathways, DNA damage repair, proteostasis and mitochondria [59].

There is a number of excellent detailed reviews on the “mitochondrial” hypothesis for HD that have been released in the past [60–62] and more recently [63–67]. Each presents an overview of many different types of mitochondrial defects (and more generally defects in energy metabolism) in HD. The mechanisms underlying these defects are ill-defined. Mutant Htt can interact functionally with the outer mitochondrial membrane [68–71], possibly through a set of mitochondrial proteins [5,65]. Besides mechanisms linked to a direct interaction with mutant Htt, transcriptional changes induced by mutant Htt indirectly disturb the regulation of mitochondrial/energy homeostasis. Deregulation of post-transcriptional modification of mitochondrial proteins may also

be involved (ubiquitination, acetylation, nitrosylation, protease-mediated cleavage, phosphorylation ...).

3. Mitochondrial disorders and mitochondrial toxins suggest preferential vulnerability of the striatum

The striatum is extremely vulnerable to the impairment in oxidative energy metabolism [60,62]. Genetic mitochondrial defects can lead to striatal degeneration and, clinically, to choreoathetosis and dystonia. Point mutations in mitochondrial genes coding for several subunits of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductases) can lead to putaminal degeneration and dystonia, in association with other severe alterations such as epilepsy, stroke and optic nerve atrophy. Nuclear genes encoding for mitochondrial proteins [e.g. complex II (SDHA, Fp subunit and SDHAF1); complex III, (subunit VII); MR-1 (Myofibrillogenesis regulator-)] can also lead to neurological abnormalities reminiscent of Leigh syndrome [72–75].

Reported cases of accidental (or suicidal) poisoning with mitochondrial toxins (e.g. cyanide, methanol, 3-nitropropionic acid) also show that the striatum is extremely sensitive to acute blockade of oxidative energy metabolism. In man, the ingestion of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NP) produces putaminal necrosis and delayed dyskinesias and dystonia [76,77]. Systemic administration of 3-NP produces in rats [78,79] and in non-human primates [80] causes preferential degeneration in the caudate/putamen, abnormal movements and frontal type cognitive deficits that are highly reminiscent of HD [81,82]. The mechanisms of 3-NP toxicity in vivo involve impaired Ca^{2+} homeostasis, calpain and caspase activation, and JNK activation that are also involved in HD pathogenesis [82]. However, 3-NP does not produce transcriptional changes and abnormal protein aggregation and disruption of proteostasis that are comparable to those found in transgenic and knock-in mice expressing mutant Htt [83,84].

4. General mechanism of mitochondrial defects in HD patients

4.1. Mitochondrial enzymes and high energy phosphates

4.1.1. Defects in respiratory chain enzymes

Defects in the respiratory chain in HD have been observed in early biochemical studies. Severe reduction in the activity of complex II/III and milder reduction of complex IV were found in post mortem samples of the caudate/putamen in HD patients [85–89]. Analysis of subunits of the mitochondrial complexes in striatal samples from small cohort of HD patients indicated preferential (profound, ~70%) reduction in the expression of complex II subunit I_p (SDHB) [90]. Interestingly, SDHB or SDHA mRNA in HD caudate are not reduced [91]. The cerebral cortex showed minor changes in respiratory chain enzymes [86,88,90,92]. Massive loss of aconitase activity has been found in the caudate (~90%), and putamen (~70%) [92,93]. Loss of the pyruvate dehydrogenase complex was also found [87,94]. No changes were found in samples from patients at early stages of the disease [95].

In a transgenic mouse model of HD (R6/2) with limited cell loss, aconitase and pyruvate dehydrogenase have been found to be decreased to various extents [96]. It seems that in addition to presenting reduced levels, many proteins are modified by oxidative stress in these transgenic models [97]. Proteomics analysis of R6/2 brain showed that the expression of a number of proteins related to brain energy metabolism/mitochondrial proteins are changed [98]. However, the changes can be seen in young animals and undetectable in severely symptomatic mice or the other way around. Change in expression of mitochondria complexes have also studied

in transgenic mice expressing a short N-terminal fragment of mutant Htt with 82 polyglutamines (N171-82Q mice). Blue native gel analysis of mitochondrial complex showed reduced levels of complex II [99]. Loss of complex II (activity, levels of Ip protein) was found in R6/1 mice and in the rat model using lentiviral vectors to express mutant Htt in the striatum [99]. In mice expressing a short (N-ter-171 a.a.) mutant Htt fragment only in the striatum (D9-N171-98Q), reduction in complex II activity was also found in young non-symptomatic mice, while the activity of the complex increases in older symptomatic mice [100]. In primary culture of striatal neurons, overexpression of a N-terminal domain of mutant Htt using lentiviral vectors also leads to a progressive loss of complex II subunit Ip protein, while the levels of Fp protein were relatively preserved [90]. This loss of Ip protein was not correlated with reduction in SDHB mRNA, indicating a post-transcriptional mechanism. The re-expression of complex II subunits using lentiviral vector in these *in vitro* and *in vivo* rat models was shown to significantly block the death of striatal neurons, indicating that the loss of Ip subunit could be causal in mutant Htt toxicity [90,99,101]. Reduced activity of complex II-III or levels of complex II proteins were reported in a few other cellular models (Neuro2A and HeLa cells expressing Htt exon 1 [102] and interestingly also in yeast expressing mutant Htt [103]. Reduction of complex II, seen in the “aggressive” (R6/1, N171-82Q) mouse and rat (LV) models of mutant Htt toxicity, was not seen in rodent models with more progressive adult BACHD mice, and knock-in 140CAG mice (Damiano, Malgorn, Francelle, Brouillet, unpublished results). Different groups studied complex II protein levels in other genetic animal models of HD and could not find major modifications [e.g. Refs. [104–106]]. Thus, preferential loss/disruption of complex II is likely a relatively late event associated to actual neurodegeneration/death of neurons. In some mice models with no obvious neuronal cell loss, the changes in complex II could be only transient, and could be rapidly compensated with age and disease progression.

4.1.2. Levels of high energy phosphates

The effect of mHtt on ATP levels was studied in isolated mitochondria from HD mouse models of HD. ATP has been also studied in cellular models expressing mHtt. In living cell, ATP lifetime is short and ATP concentrations can drop in a matter of seconds when the source of nutriment such as glucose is suppressed, the respiratory chain is blocked, proton-force disrupted or oxygen supply cut. Measurement of ATP by extraction in cultured cells is relative easy and reliable since proteins using ATP can be rapidly inactivated and extracted ATP reflect levels in the living cells. In addition, new fluorescent probes for ATP, give the possibility to determine ATP levels using video-microscopy in living cells expressing mHtt. In most studies, levels in ATP at rest are not markedly changed in neurons expressing mHtt [e.g. Refs. [104,106]]. However, ATP levels (or ATP/ADP ratio) have been found reduced in peripheral HD lymphoblast along with increased phosphocreatine levels, immortalized cells from HDhQ111 knock-in mice and cultured neurons from YAC128 [107,108]. Differences in experimental protocols might explain the existence of discrepancies between different studies.

In vivo, measurement of brain levels of ATP and phosphocreatine (PCr) are difficult for this reason. Rapid decapitation, even using freeze camp techniques, always underestimates actual concentrations. One way to bypass this limitation of ATP assessment is to use microwave methods where all the proteins that degrade/use ATP (including creatine kinase) are destroyed in a few second. Then precise measures of metabolites can be achieved after HPLC separation. This difficult method has been used recently by Mochel and collaborators to measure ATP and its metabolites in brain regions of R6/2 mice at different ages. Results showed that ATP concentration

was decreased in striatum, hippocampus and cerebral cortex of R6/2 [109]. These decreases were found to be associated with increased PCr at 8 and 12 weeks of age. Even at 4 weeks of age, when mice are considered “presymptomatic”, PCr concentration was increased in their brain. Similar trends have been observed in non-symptomatic 4-month-old knock-in HDhQ111/+ mice. These early changes in PCr and increased levels of brain levels were associated with reduced levels of brain creatine kinase (BB-CK) and activation of the AMP-dependent protein kinase (AMPK) signaling. Upregulation of the PCr may reflect adaptive response mechanisms attempting to counteract the early energy deficit prior to the decrease in ATP known as a late marker of cell distress.

The only way to look at ATP levels in a non-invasive manner *in vivo* is to use magnetic resonance spectroscopy of ^{31}P nucleus. This method is very challenging because the signal/noise ratio is very low, especially in small animal (mice or rats) where the brain is small. A few key studies *in vivo* in patients and rodent HD models are presented and discussed later.

4.2. Mitochondrial membrane potential

There are a number of studies that showed that mitochondria from cells expressing mutant Htt show decreased membrane potential, especially when cells are challenged with toxic stimuli. Lymphoblasts derived from lymphocytes from HD patients showed increased stress-induced apoptotic cell death, which is associated with great mitochondrial membrane potential loss [71,110]. Loss of mitochondrial membrane potential was recently reported by Rego's group and collaborators [107]. Clonal cells derived from knock-in mice harbouring a pathologically expanded CAG repeat tract (STHdhQ111/Q111) show reduced mitochondrial membrane potential [111,112] and show high sensitivity to Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition [68,113]. This sensibility was confirmed in mitochondria isolated from HD transgenic rats [114]. STHdhQ111/Q111 cells also show higher vulnerability to permeability transition and death when treated with the 3-NP, an effect that could be prevented by cyclosporine-A [115] or expression of hMTH1, a human hydrolase that degrades oxidized purine nucleoside triphosphates [111]. It has also been demonstrated that recombinant mutant Htt (short N-terminal fragment) could directly trigger loss of membrane potential and permeability transition, likely through an interaction with the outer mitochondrial membrane [68,116]. *In situ* studies using fluorescent dyes (JC-1, Mito-Tracker Red) also showed that neuronal cells expressing mutant Htt could display reduced mitochondrial membrane potential at rest [90,117]. However, loss of mitochondrial membrane potential at rest is not seen in all models of HD. In unchallenged isolated mitochondria prepared from Ki105CAG mice, no modification of mitochondrial membrane potential was observed [106].

4.3. Mitochondrial Ca^{2+} buffering capacity

Increased cytoplasmic Ca^{2+} levels are toxic to neurons, at least in part through mitochondrial mechanisms [30,57,118]. Impaired Ca^{2+} homeostasis in HD might have different causes. Alteration of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis may also result from different extra-mitochondrial origins, especially increased entry of Ca^{2+} in the cell and increased release/reduced uptake from intracellular store, such as the ER. There is one abnormality/change related to mitochondria and Ca^{2+} that appears to be consistently observed across most of HD models: The Ca^{2+} buffering capacity of cells expressing mutant Htt is reduced. This was first demonstrated by Panov and collaborators in lymphoblasts derived from lymphocytes of HD patients [71]. Similarly, reduced Ca^{2+} loading capacity was found in the brains of YAC72Q mice [71]. Compared to

mitochondria from control cells (STHdhQ7/Q7), the mitochondria from clonal striatal cells with mutant Htt (STHdhQ111/Q111) undergo permeability transition at a lower Ca^{2+} concentration when treated with increasing Ca^{2+} loads and have a reduced capacity to take up Ca^{2+} [119]. Isolated mitochondria from transgenic rats expressing mutant Htt, show reduced rates of Ca^{2+} accumulation compared to control rats [114]. In neuronal cultures expressing the N-terminal part of Htt with a 104 glutamine repeat, calcium overload induced by thapsigargin resulted in a significant decrease in mitochondrial calcium uptake compared to wild type cells which showed a transient increase in mitochondrial calcium [113]. However, not all HD models show reduced brain mitochondrial Ca^{2+} loading capacity. The latter was found increased in 12 week old R6/2 mice and 12 month old YAC128Q while no changes were found in knock-in 150Q mice [120]. More recently, Chang and collaborators observed a higher level of mitochondrial Ca^{2+} loading in embryonic fibroblasts from YAC128 mice compared to wild type mice [121]. All results on this aspect are not always congruent depending on the animal/cell models and laboratory. This has been precisely reviewed recently [67].

4.4. Abnormal dynamics and unbalanced fusion/fission mechanisms

Changes in organelle dynamics have been hypothesized to play a role in neurodegenerative diseases especially in HD [122]. Two types of modification can be depicted: motility or morphology. First, reduced mitochondrial mobility could reduce the incorporation of certain proteins leading to mitochondrial dysfunction [105]. An elegant study using live cell video microscopy showed that aggregates impair mitochondrial movements along neuronal processes. Mitochondria may remain embedded in the aggregate formations in the somato-dendritic compartment [123]. A very interesting observation in this study is that full length mutant Htt, more than the short N-terminal fragments, impairs mitochondrial mobility. More recently mitochondrial motility defects were observed in primary neurons from rat expressing mutant Htt-containing exon1 [124] or from BACHD mice [125].

On the other hand, mitochondrial morphological changes can also result in dysfunction. In primary cultures of cortical neurons treated with 3-NP, mitochondrial fission occurs and is preceded by an ATP drop and a ROS increase, the latter being blocked by a NMDA antagonist, leading to neuronal rescue [126]. Mitochondrial fission increase and fusion decrease has been shown in different models of cell lines or primary cultures expressing wild type or mutant Htt [124,125,127–129]. This mitochondrial fission was associated with an increase of Dynamin Related Protein (Drp1) and Fis1 and a decrease of Mitofusins-1 and -2 expression [129]. This GTPase, Drp1, interacts with mutant Htt resulting in an increase of its activity and overexpression of an inactive form of Drp1 leads to the blockade of mitochondrial fission [124,125]. Interestingly, treatment of HD transgenic mice with an inhibitor of Drp1 (p110-TAT) blocks Drp1 association with mitochondria, reduced motor deficits, and mortality in mice [130]. Costa and collaborators demonstrated that overexpression of OPA1 or inactive Drp1 but not Mitofusin-1 rescue mitochondrial cristae remodelling and the increased susceptibility to apoptosis of mutant Htt-expressing cells [189]. Other mechanisms playing a role in mitochondrial fission were also described such as Cdk5 [131], p53 [130] or S-nitrosylation [127].

4.5. PGC-1 alpha, NRF and PPAR γ , PPAR δ

Another very interesting mechanism that has recently been proposed to be involved in HD-linked striatal degeneration is the PGC-1alpha pathway. Reduced expression of PGC-1alpha has been

reported in HD models [132,133]. PGC-1alpha is a nuclear co-activator that plays a major role in mitochondrial biogenesis [132,133]. Mice that are nullizygous for PGC-1alpha display abnormalities related to energy metabolism and strikingly develop striatal lesions [134]. Increasing PGC-1alpha expression is neuro-protective against mutant Htt toxicity and, on the contrary, when PGC-1alpha is knocked down, neurons are highly vulnerable to mutant Htt toxicity in cell culture and in vivo [133]. Other family members (PGC-1beta and PGC-1 Related co-activator –PRC), also known to regulate important aspects of mitochondrial biogenesis and of respiratory enzymes, could be also involved [135]. In line with this, it cannot be excluded that downstream targets of PGC-1alpha, the nuclear respiratory factors, NRF-1 and NRF-2 [136] could also participate in HD-linked mitochondrial dysfunction. More recently, the ligand-activated transcription factor named peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) downstream targets of PGC-1alpha were involved in HD pathogenesis. Activation of PPAR γ or PPAR δ by agonists could block Htt-induced neurotoxicity [137,138], or restore the expression of PGC-1alpha and Bcl2, and the mitochondrial mass in the brain of HD mice [139]. Administration of bezafibrate, a pan-PPAR agonist, increases the expression of PGC-1alpha and mitochondrial biogenesis, and improves phenotype and survival in R6/2 transgenic mice, it also restores PPAR γ , PPAR δ , PGC-1alpha signaling pathway and enhanced mitochondrial biogenesis in BACHD mice [140].

4.6. Tim23 and mitochondrial import

Another mechanism potentially involve in mitochondrial dysfunction in HD can be mitochondrial import. In fact, as 99% of the mitochondrial proteins are encoded by the nuclear genome, once synthesized these proteins need to be translocated to the mitochondrial membranes and matrix. This function is provided by a group of proteins named translocators in the outer (TOM) or inner (TIM) mitochondrial membrane. In 2014, Yano and collaborators demonstrated that mutant Htt interacts with TIM23 which inhibits protein import in vitro [141]. Moreover, protein import defects have been pinpointed in mitochondria from brain synaptosomes of presymptomatic HD mice or primary neurons expressing mutant Htt. Finally, this group demonstrated that overexpression of TIM23 complex subunits in mutant Htt-expressing neuronal primary cultures decreases import defects and neuronal death [141].

4.7. Mitophagy

Autophagy is a self-degrading process (protein degradation and organelle turnover) necessary to the cell physiology but which has also been involved in human diseases. Impaired autophagic function may be considered as a possible mechanism in neurodegeneration [142] and the pathogenesis of several neurodegenerative disorders including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, and Huntington's disease [143]. If we focus on mitochondria, the autophagic process involved in mitochondrial clearance is named mitophagy. Mitophagy can be useful to selectively degrade dysfunctional mitochondria in order to maintain a healthy mitochondrial network. In MEFs from mutant Htt knock-in mice, starvation-induced macroautophagy is deficient compared to those from wild type htt knock-in mice. In addition, both HD neuronal and MEF cells expressing mutant Htt show a higher percentage of depolarized mitochondria when compared their corresponding wild type cells [144]. Later, a beginning of understanding on which mechanisms lead to mitophagy has been made. It was shown that, in HdhQ111 striatal cells, mHtt alters mitophagy through blockade of mitochondria-containing autophagosome formation. This defect

can be partially restored by PINK1 overexpression [145]. Moreover, Holzbaur's team demonstrated that Htt and HAP1 co-localize with LC3-II-containing autophagosomes to control autophagosome dynamics. Expression of mutant Htt inhibits autophagosome/lysosome fusion leading to inefficient autophagosome maturation and finally resulting in defective clearance of both polyQ-htt aggregates and dysfunctional mitochondria [146]. A new mechanism, named “micro mitophagy”, was highlighted in 2015. Under oxidative stress, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) undergoes oxidative modifications and becomes catalytically inactive. Oxidized GAPDH detects and associates with damaged mitochondria for degradation by lysosomes. In mutant Htt-expressing cells, inactivated (oxidized) GAPDH interacts with mutant Htt at the outer mitochondrial membrane which results in blockade of engulfment by lysosomes and a consecutive defect in micro mitophagy with accumulation of damage mitochondria deleterious for the cells [147].

5. Possible integrated mechanisms of mitochondrial dysfunction in HD

As discussed above, mutant Htt (N-terminal small fragments) can possibly directly interact with the outer mitochondrial membrane and mitochondrial proteins to alter mitochondrial function and indirectly mHtt could disrupt mitochondrial homeostasis. How the different/multiple effects of mHtt (or loss of function of wild type Htt) act in concert and participate to neuronal degeneration is uncertain. As mentioned earlier, defects in respiratory chain enzymes may be considered relatively late events in this processes. It is likely that transcriptional changes happen relatively early in HD patients and mouse models. Transcriptional changes can be reverted by HDAC inhibitors, and interestingly, HDAC inhibitors have been shown to revert some of the functional mitochondria defects in neurons expressing mHtt [148]. Whereas at rest/basal conditions, HD mitochondria may function normally, many experiments indicate that their capability to cope with different types of challenges (such as Ca^{2+} load; oxidative stress; full stimulation to produce ATP) appears reduced. In the neurons *in situ*, especially in the striatum, where the mitochondria are constantly stimulated for basal energy demand linked to glutamatergic synaptic transmission, this particular susceptibility could translate into a progressive cascade of events more and more deleterious, with eventually activation of cell death molecular machinery.

One important integrated key aspect of the probably complex/multifactorial integrated mechanisms underlying mHtt-induced mitochondrial defects is the anomalies in Ca^{2+} homeostasis. This has been discussed in many reviews in detail, and can be summarized as follows.

Mitochondria that would have a reduced capacity to cope with intracellular Ca^{2+} handling could render neurons exquisitely vulnerable to Ca^{2+} entry associated with recurrent activation of glutamatergic synapses in the striatum. Primary defects in mitochondria/energy metabolism *in vivo* render striatal neurons extremely sensitive to excitotoxicity, especially when depending on activation of NMDA receptors [149,150]. mHtt-induced mitochondrial defects could facilitate the deleterious effects triggered by NMDA receptors in HD. The mitochondrial Ca^{2+} defects would act in synergy with m-Htt-induced modification of Ca^{2+} homeostasis linked to activation 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors ($\text{InsP}(3)$ R1) and Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) [151]. Mitochondrial damages could also lead to increased ROS production which through a vicious cycle could further produce perturbation of molecular components involved in maintenance of membrane potential, protein import machinery, Ca^{2+} uptake/sequestration, production of molecules that are crucial to supply

cellular energy demand such as ATP and phosphocreatine production.

6. In vivo evidence for energy/mitochondrial impairment in HD

6.1. Pioneering studies using brain imaging methods in patients and animal models

Other indications for energy metabolism problems in HD patients were reported. In particular, early striatal hypometabolism was detected *in vivo* using positron emission tomography and [^{18}F] fluoro-deoxyglucose [60,152]. Increased lactate concentrations were found in the cortex of symptomatic HD patients using proton (^1H) magnetic resonance MR spectroscopy (MRS) [153,154]. Lactate/pyruvate ratio was found elevated in the CSF of HD patients [155]. In one NMR study, half of the pre-symptomatic HD patients examined showed increased lactate concentration in the striatum [154].

Pioneering studies in rats with striatal dysfunction/degeneration associated with excitotoxic cell death after intra-striatal injection of mitochondrial toxins (malonate, quinolinate, 3-NP) or chronic systemic administration of 3-NP, evaluated the potential interest of using MRS for neurological conditions associated with metabolic defects, especially HD. These studies demonstrated that MRS was able to clearly show mitochondrial impairment in the striatum *in vivo*. Loss of glutamate and N-acetyl-aspartate (NAA), increased lactate, were hallmarks of early effects of the mitochondrial toxins. Interestingly, these MRS studies, combined with MRI showed that while 3-NP was ubiquitously distributed in the brain after systemic administration, it preferentially impacted oxidative energy metabolism in the striatum [79,156–159]. MRS also showed in non-human primates chronically treated with 3-NP that levels of brain metabolites (NAA and glutamate) were significantly decreased as a consequence of partial blockage of mitochondrial complex II. This suggested, that changes in these metabolites could reflect mitochondria dysfunction. In addition 3-NP-induced decreases in NAA were shown to be reverted by the arrest of the 3-NP administration, indicating that these metabolic changes were reversible, and not simply the consequence of neuronal cell death. More recently ^1H MRS and other new MRS methods have been used to investigate metabolic changes in genetic animal models of HD as well as in HD gene carriers, which are summarized below.

6.2. Recent imaging studies using brain imaging methods in patients and animal models

6.2.1. Brain metabolite measurement by ^1H MRS

For several years, ^1H -MRS has been used in the context of neurodegenerative disease, and especially in HD, in order to identify relevant and early biological markers of the disease. This non-invasive method is promising as it can provide information at cellular level in a living organism. Striatal concentration of NAA measured by ^1H -MRS using clinical magnet (3T) were found to be reduced in cohorts of symptomatic HD patients [160]. Although smaller, reduction was also seen in HD gene carriers (pre-manifest) subjects [160]. The use of a 7T [161,162] permitted ^1H -MRS with increased detection sensitivity, allowing metabolite concentrations measurement in smaller brain regions, so that the caudate and putamen could be separately examined. Reduced NAA, glutamate and creatine concentration were measured in putamen. Intriguingly, glutamate was not found significantly reduced in the caudate nucleus [161]. This emphasizes the interest of methods that could give the possibility of studying simultaneously different brain regions in patients.

In addition, preclinical studies performed of animal models of HD are very precious as they can provide valuable information about physiopathology of the disease. Moreover, they allow a longitudinal follow-up of disease progression, which would be very hardly achievable with HD patients. The large variety of rodent models of HD permits to mimic various form of the pathology. The transgenic R6/2 mouse is a severe HD model which reproduces early onset of HD [163]. On the contrary, knock-in models such as Q111 or Ki140CAG models are more progressive models with latter onsets of symptoms [25]. The latter models are probably closer to disease progression observed in HD patients.

Interestingly, similarly to results from HD patients, a majority of animal studies suggests early metabolic changes in the brain. All studies performed in mouse models of HD showed an increase in glutamine (Gln) and a decrease in NAA [164–166], excepted in Q111 where unchanged NAA level can be explained by the relative young age of mice, whereas symptoms onset appears at more than 100 weeks [25]. Decreases in glutamate and taurine concentrations were also measured in Ki140CAG mice [165], Q111 mice [163] and of glutamate concentration in R6/2 mice [164,167]. Interestingly, in knock-in HD mice harbouring a smaller CAG expansion (HdhQ111 or Ki140CAG), no glutamate or NAA changes were found at very early ages (3–4 months), although reorganization of high energy phosphate metabolites was seen (see below) [163]. Loss of glutamate, NAA and creatine have been seen in z175 knock-in mice at 6 months of age and increased levels of glutamine were detected at 9 months of age [168,169]. These changes were more profound in 12 month-old HD mice, indicating a progression of the pathology. In most of ^1H -MRS studies, it is commonly admitted that glutamate and NAA are mainly located in neurons. Consequently, their concentrations can serve as a potential marker of the neuronal compartment [170–172]. A modification of their concentrations, particularly a decrease, can suggest an alteration of neuron integrity or functions. These changes suggest an astrocyte/neuron imbalance in the utilization of energy substrates.

However, modification (either increase or decrease) of brain metabolites concentration can vary depending on the type of HD model considered. In R6/2 mice, which have a more progressive phenotype, with markedly reduced life span (animal die around 12–18 weeks of age) and profound atrophy of the striatum and cerebral cortex, changes are more variable over time [166]. The changes do not follow the same trends over time. These MRS results are reminiscent of the data obtained in R6/2 on proteomic or transcriptomic characterization. This likely reflects major adaptive changes while brain atrophy progresses, when HD mice get older.

Thus, whatever the differences between models, the pattern of changes of brain metabolites clearly distinguishes HD mice from control littermate [163,173] and is consistent with defects in energy metabolism.

How these metabolic alterations seen by MRS could be related to mitochondrial anomalies is unclear. As mentioned earlier, primary mitochondrial defects induced by the mitochondrial toxin 3-NP leads to similar metabolic changes as seen by MRS in vivo. Loss of NAA is also consistent with mitochondrial defects since this metabolite is at least in part synthesized in mitochondria by the enzyme ALAT in neurons. Reduction in glutamate levels may also indicate anomalies in TCA (Krebs) cycle. Indeed, glutamate is in equilibrium with alpha-ketoglutarate in the Krebs cycle. Previous works performed in non-human primates chronically treated with the mitochondrial toxin have demonstrated that Krebs cycle defects can lead to alteration of glutamate concentration in the brain 3-NP [156,157].

6.2.2. A novel MRI method to establish brain map of glutamate: gluCEST imaging

Although very promising, one limitation of the ^1H and ^{31}P -MRS methods is that measurements are confined to large voxels due to the lack of sensitivity of these methods. Consequently, mapping metabolites distribution in the brain with standard ^1H -MRS would be very difficult and time-consuming. Chemical Shift Imaging (CSI) is able to map metabolites distribution, but the voxel size (a few μL) remains relatively large to distinguish small brain structure with few partial volume effects, especially in mice. It would be of major interest to therefore identify metabolic biomarkers that could be monitored in the entire brain and with good anatomical resolution.

Recently, CEST imaging (Chemical Exchange Saturation Transfer) has been proposed to detect dilute molecules containing labile protons. Exchangeable protons such as amine ($-\text{NH}_2$) or amide ($-\text{NH}$) groups, exhibit a resonance frequency that is shifted relative to bulk proton frequency. These exchangeable protons can be selectively saturated using radiofrequency pulse. As both pools of protons are constantly in exchange, the saturation can be transferred from one pool (shifted protons) to another (bulk protons), leading to a decrease of water signal. Interestingly, some metabolites such as glutamate, glucose or myo-inositol fulfill exchange properties to give a CEST signal [174] so that is possible to map their spatial distribution in the brain using CEST imaging.

The potential of CEST imaging to map glutamate level (gluCEST) has already been demonstrated in both rodent and human brains at high magnetic fields ($\geq 7\text{ T}$) [175,176]. In a recent study, gluCEST has also been evaluated as a potential biomarker of HD [165]. In this study, a knock-in genetic mouse model of HD (Ki140CAG) with a slowly progressive appearance of the symptoms was used to evaluate glutamate levels alterations in the whole brain. Both heterozygous and homozygous mice for the gene encoding the mutant htt were compared to wild type littermates. Brain maps of glutamate were established in each group of mice using gluCEST imaging. GluCEST levels measured in homozygous mice were markedly reduced as compared with wild type littermates in most of brain structures. Surprisingly, gluCEST maps revealed that the decrease was particularly pronounced in the corpus callosum in both homozygous and heterozygous mice. As gluCEST contrast is almost proportional to glutamate concentration at physiological concentrations [175], a decrease of gluCEST contrast was consistent with a decrease of glutamate concentration. This suggests that corpus callosum which connects both hemispheres could be highly vulnerable in HD.

These results obtained in a mouse model of HD constitute the first report of gluCEST as a potential biomarker of HD. Of interest, recent studies have demonstrated the feasibility of gluCEST imaging in human brain [175,177]. Even if this technic requires high magnetic fields ($\geq 7\text{ T}$), emergence of high field clinical scanners may open the way to clinical applications of gluCEST imaging.

6.2.3. ^{31}P -MRS for high energy phosphates

Because it is methodologically challenging, ^{31}P -MRS has been rarely used to explore energy metabolism in HD patients. One pioneering study found no major change in ATP levels in the putamen of HD patients [178]. In muscle, phosphorus NMR spectroscopy showed reduced ATP production, as seen by reduced recovery after exercise in HD patients [179]. More recently, Saft and collaborators replicated these findings in a different cohort of HD patients and further extended the research to premanifest HD gene carriers showing also defects in ATP production in these subjects [180]. In the meantime methods have been optimized to increase sensitivity for brain ^{31}P -MRS. Recently, Mochel and colleagues studied early stage symptomatic patients and age-matched controls [181]. They used ^{31}P -MRS to measure ATP, PCr and inorganic

phosphate (Pi) at rest, during activation of the occipital cortex by visual stimulation and after. At baseline, concentrations of the three metabolites in HD patients were similar to those of control subjects. They observed in control subjects a mild but significant increase (~12%) in the Pi/PCr and the Pi/ATP ratios during brain activation, reflecting utilization of ATP and increased adenosine diphosphate concentrations. The ratios return to normal levels during the recovery. Interestingly, both ratios remained unchanged in HD patients during visual stimulation. Similar findings could be replicated in another cohort of HD patients and controls, and in this cohort, ³¹P-MRS could be repeated twice at 1 month interval [182], showing that the defect in high energy phosphate change during visual activation was stable over time in HD patients.

The use of ³¹P-MRS in animal model is more challenging than in human, because of sensitivity limitations of the method, even at high magnetic fields. Recent measures of ATP concentration and other phosphorylated metabolites using ³¹P-MRS led to interesting results in the knock-in HdhQ111 mouse model of HD. Although results are not totally conclusive, Tkac and collaborators found that while ATP was generally found unchanged in HD mouse brains, increased levels of calculated ADP and creatine with reduction in PCr were found at early ages (6 weeks) [163]. However these changes tended to disappear in 13 week-old mice [163]. In the same study, R6/2 mice were also characterized at 11 weeks of age (i.e. symptomatic). They showed no major alterations in high energy phosphates levels or metabolism. Preliminary studies have been reported by Tíret and collaborators [183] by ³¹P-MRS in BACHD rats. Results obtained in a small cohort of aged rats (18 month-old) indicate that under baseline condition (anaesthetized rats) brain levels of ATP are not markedly changed in the brain of these animals when compared to wild type littermates, while those of PCr are slightly increased. However, saturation transfer ³¹P-MRS showed that the rate of synthesis of ATP is reduced in the brain of BACHD rats suggesting a re-organization of oxidative phosphorylation (ATP synthesis), consistent with mitochondrial defects. In parallel, the rate of creatine kinase remained unchanged.

6.3. What MRS could bring to HD patients?

The novel results obtained by in vivo imaging in mouse and rat models of HD and cohort of HD patients suggest that early metabolic adaptation occurs in HD, to counteract potential major dysfunction. However, these brain imaging changes could constitute key “biomarkers” of energy defects. This could be of particular interest in clinical trial. Indeed functional brain imaging could help to determine whether a novel therapy rapidly produces a potentially biological effect in the brain (drug engagement). This aspect has been recently illustrated two promising studies in small cohorts of HD patients. Chronic treatment of HD patients with the dietary metabolic substrate triheptanion (a C7 fatty acid that can fuel the Krebs cycle by producing propionyl-CoA and acetyl-CoA), rapidly corrected the absence of metabolic response (ATP/PCr recovery) after exercise in muscles and during brain visual stimulation as seen with ³¹P-MRS [182,184].

Since experimental therapies targeting the mitochondria and energy metabolism (e.g. dietary brain fuels [182,184], modulators of Sirtuins [112], antioxidants [185,186], PPAR- δ activators [137], and mitochondrial protectant such as Olesoxime [187,188]) show great promise, the use of in vivo methods to characterize energy defects in HD patients could be of prime interest. Currently, all methods cannot be directly applied in clinic, but their utilization for in vivo studied in animal models might be crucial to optimize the determination of drug efficacy/mechanisms, which constitutes an indirect asset for therapeutics research for HD gene carriers.

Acknowledgements

E.B., J.V., J.P. and J.F. are recipient of a grant from Agence Nationale de la Recherche (“HDeNERGY” project, ANR-14-CE15-0007-01) and a grant for NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (“Investissement d’Avenir”, ANR-11-INBS-0011).

References

- [1] D.C. Chan, Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development, *Cell* 125 (2006) 1241–1252.
- [2] D.R. Green, G. Kroemer, The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* 305 (2004) 626–629.
- [3] D.R. Green, J.C. Reed, Mitochondria and apoptosis, *Science* 281 (1998) 1309–1312.
- [4] D.D. Newmeyer, S. Ferguson-Miller, Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell* 112 (2003) 481–490.
- [5] M.T. Lin, M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature* 443 (2006) 787–795.
- [6] The Huntington’s Disease Collaborative Research Group, A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington’s disease chromosomes. The Huntington’s Disease Collaborative Research Group, *Cell* 72 (1993) 971–983.
- [7] P.S. Harper, Huntington’s Disease, 1991.
- [8] R.J. Ferrante, N.W. Kowall, M.F. Beal, J.B. Martin, E.D. Bird, E.P. Richardson Jr., Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington’s disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46 (1987) 12–27.
- [9] E.H. Aylward, B.F. Sparks, K.M. Field, V. Yallapragada, B.D. Shpritz, A. Rosenblatt, J. Brandt, L.M. Gourley, K. Liang, H. Zhou, R.L. Margolis, C.A. Ross, Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease, *Neurology* 63 (2004) 66–72.
- [10] J. Kassubek, F.D. Juengling, T. Kioschies, K. Henkel, J. Karitzky, B. Kramer, D. Ecker, J. Andrich, C. Saft, P. Kraus, A.J. Aschoff, A.C. Ludolph, G.B. Landwehrmeyer, Topography of cerebral atrophy in early Huntington’s disease: a voxel based morphometric MRI study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75 (2004) 213–220.
- [11] H.H. Ruocco, I. Lopes-Cendes, L.M. Li, M. Santos-Silva, F. Cendes, Striatal and extrastriatal atrophy in Huntington’s disease and its relationship with length of the CAG repeat, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 1129–1136.
- [12] S.J. Tabrizi, R.I. Scahill, G. Owen, A. Durr, B.R. Leavitt, R.A. Roos, B. Borowsky, B. Landwehrmeyer, C. Frost, H. Johnson, D. Craufurd, R. Reilmann, J.C. Stout, D.R. Langbehn, T.-H. Investigators, Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington’s disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data, *Lancet Neurol.* 12 (2013) 637–649.
- [13] R.J. Ferrante, M.F. Beal, N.W. Kowall, E.P. Richardson Jr., J.B. Martin, Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington’s disease, *Brain Res.* 411 (1987) 162–166.
- [14] R.J. Ferrante, N.W. Kowall, M.F. Beal, E.P. Richardson Jr., E.D. Bird, J.B. Martin, Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington’s disease, *Science* 230 (1985) 561–563.
- [15] A. Petersen, M. Bjorkqvist, Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington’s disease, *Eur. J. Neurosci.* 24 (2006) 961–967.
- [16] M.Y. Heng, P.J. Detloff, R.L. Albin, Rodent genetic models of Huntington disease, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 1–9.
- [17] M.S. Levine, C. Cepeda, M.A. Hickey, S.M. Fleming, M.F. Chesselet, Genetic mouse models of Huntington’s and Parkinson’s diseases: illuminating but imperfect, *Trends Neurosci.* 27 (2004) 691–697.
- [18] D.S. Howland, I. Munoz-Sanjuan, Mind the gap: models in multiple species needed for therapeutic development in Huntington’s disease, *Mov. Disord.* 29 (2014) 1397–1403.
- [19] L. Menalled, D. Brunner, Animal models of Huntington’s disease for translation to the clinic: best practices, *Mov. Disord.* 29 (2014) 1375–1390.
- [20] L.B. Menalled, M.F. Chesselet, Mouse models of Huntington’s disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 32–39.
- [21] M. Gray, D.I. Shirasaki, C. Cepeda, V.M. Andre, B. Wilburn, X.H. Lu, J. Tao, I. Yamazaki, S.H. Li, Y.E. Sun, X.J. Li, M.S. Levine, X.W. Yang, Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice, *J. Neurosci.* 28 (2008) 6182–6195.
- [22] L.B. Menalled, Knock-in mouse models of Huntington’s disease, *NeuroRx* 2 (2005) 465–470.
- [23] M.F. Beal, R.J. Ferrante, Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington’s disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 373–384.
- [24] S.P. Brooks, S.B. Dunnett, Mouse models of Huntington’s disease, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 22 (2015) 101–133.
- [25] L. Menalled, B.F. El-Khodori, M. Patry, M. Suarez-Farinas, S.J. Orenstein, B. Zahasky, C. Leahy, V. Wheeler, X.W. Yang, M. MacDonald, A.J. Morton, G. Bates, J. Leeds, L. Park, D. Howland, E. Signer, A. Tobin, D. Brunner, Systematic behavioral evaluation of Huntington’s disease transgenic and knock-

- in mouse models, *Neurobiol. Dis.* 35 (2009) 319–336.
- [26] M. Borrell-Pages, D. Zala, S. Humbert, F. Saudou, Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies, *Cell Mol. Life Sci.* 63 (2006) 2642–2660.
 - [27] E. Cattaneo, C. Zuccato, M. Tartari, Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005) 919–930.
 - [28] A. Reiner, I. Dragatsis, S. Zeitlin, D. Goldowitz, Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival, *Mol. Neurobiol.* 28 (2003) 259–276.
 - [29] F. Saudou, S. Humbert, The biology of huntingtin, *Neuron* 89 (2016) 910–926.
 - [30] C.M. Cowan, L.A. Raymond, Selective neuronal degeneration in Huntington's disease, *Curr. Top. Dev. Biol.* 75 (2006) 25–71.
 - [31] J. Gafni, L.M. Ellerby, Calpain activation in Huntington's disease, *J. Neurosci.* 22 (2002) 4842–4849.
 - [32] J. Gafni, E. Hermel, J.E. Young, C.L. Wellington, M.R. Hayden, L.M. Ellerby, Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20211–20220.
 - [33] D. Goffredo, D. Rigamonti, M. Tartari, A. De Micheli, C. Verderio, M. Matteoli, C. Zuccato, E. Cattaneo, Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39594–39598.
 - [34] Y.J. Kim, Y. Yi, E. Sapp, Y. Wang, B. Cuiffo, K.B. Kegel, Z.H. Qin, N. Aronin, M. DiFiglia, Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 12784–12789.
 - [35] C.L. Wellington, L.M. Ellerby, A.S. Hackam, R.L. Margolis, M.A. Trifiro, R. Singaraja, K. McCutcheon, G.S. Salvesen, S.S. Propp, M. Bromm, K.J. Rowland, T. Zhang, D. Rasper, S. Roy, N. Thornberry, L. Pinsky, A. Kakizuka, C.A. Ross, D.W. Nicholson, D.E. Bredesen, M.R. Hayden, Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9158–9167.
 - [36] R.K. Graham, Y. Deng, E.J. Slow, B. Haigh, N. Bissada, G. Lu, J. Pearson, J. Shehadeh, L. Bertram, Z. Murphy, S.C. Warby, C.N. Doty, S. Roy, C.L. Wellington, B.R. Leavitt, L.A. Raymond, D.W. Nicholson, M.R. Hayden, Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin, *Cell* 125 (2006) 1179–1191.
 - [37] S.T. Lee, M. Kim, Aging and neurodegeneration. Molecular mechanisms of neuronal loss in Huntington's disease, *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 432–435.
 - [38] C. Landles, K. Sathasivam, A. Weiss, B. Woodman, H. Moffitt, S. Finkbeiner, B. Sun, J. Gafni, L.M. Ellerby, Y. Trotter, W.G. Richards, A. Osmand, P. Paganetti, G.P. Bates, Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8808–8823.
 - [39] A. Lunkes, K.S. Lindenberg, L. Ben-Haiem, C. Weber, D. Devys, G.B. Landwehrmeyer, J.L. Mandel, Y. Trotter, Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions, *Mol. Cell* 10 (2002) 259–269.
 - [40] G.P. Bates, R. Dorsey, J.F. Gusella, M.R. Hayden, C. Kay, B.R. Leavitt, M. Nance, C.A. Ross, R.L. Scallan, R. Wetzel, E.J. Wild, S.J. Tabrizi, Huntington disease, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1 (2015) 15005.
 - [41] M.T. El-Daher, E. Hagen, J. Bruyere, G. Poizat, I. Al-Ramahi, R. Pardo, N. Bourg, S. Souquere, C. Mayet, G. Pierron, S. Leveque-Fort, J. Botas, S. Humbert, F. Saudou, Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation, *EMBO J.* 34 (2015) 2255–2271.
 - [42] M. Banez-Coronel, F. Ayhan, A.D. Tarabochia, T. Zu, B.A. Perez, S.K. Tusi, O. Plotnikova, D.R. Borchelt, C.A. Ross, R.L. Margolis, A.T. Yachnis, J.C. Troncoso, L.P. Ranum, RAN translation in Huntington disease, *Neuron* 88 (2015) 667–677.
 - [43] K.L. Sugars, D.C. Rubinstein, Transcriptional abnormalities in Huntington disease, *Trends Genet.* 19 (2003) 233–238.
 - [44] J.H. Cha, Transcriptional signatures in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.* 83 (2007) 228–248.
 - [45] T. Seredenina, R. Luthi-Carter, What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol. Dis.* 45 (2012) 83–98.
 - [46] L. Francelle, L. Galvan, E. Brouillet, Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014).
 - [47] C. Zuccato, M. Tartari, A. Crotti, D. Goffredo, M. Valenza, L. Conti, T. Cataudella, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, T. Timmusk, D. Rigamonti, E. Cattaneo, Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes, *Nat. Genet.* 35 (2003) 76–83.
 - [48] S.H. Li, X.J. Li, Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease, *Trends Genet.* 20 (2004) 146–154.
 - [49] G. Liot, D. Zala, P. Pla, G. Mottet, M. Piel, F. Saudou, Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites, *J. Neurosci.* 33 (2013) 6298–6309.
 - [50] S. Finkbeiner, S. Mitra, The ubiquitin-proteasome pathway in Huntington's disease, *ScientificWorldJournal* 8 (2008) 421–433.
 - [51] Z. Ortega, M. Diaz-Hernandez, J.J. Lucas, Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol. Life Sci.* 64 (2007) 2245–2257.
 - [52] F.M. Menzies, B. Ravikumar, D.C. Rubinstein, Protective roles for induction of autophagy in multiple proteinopathies, *Autophagy* 2 (2006) 224–225.
 - [53] M.M. Fan, L.A. Raymond, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.* 81 (2007) 272–293.
 - [54] E.C. Stack, R.J. Ferrante, Huntington's disease: progress and potential in the field, *Expert Opin. Investig. Drugs* 16 (2007) 1933–1953.
 - [55] I. Bezprozvanny, M.R. Hayden, Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 1310–1317.
 - [56] L. Naia, I.L. Ferreira, E. Ferreira, A.C. Rego, Mitochondrial Ca²⁺ handling in Huntington's and Alzheimer's diseases - role of ER-mitochondria crosstalk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2016).
 - [57] L.A. Raymond, Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2016).
 - [58] M. Feyeux, F. Bourgeois-Rocha, A. Redfern, P. Giles, N. Lefort, S. Aubert, C. Bonnefond, A. Bugi, M. Ruiz, N. Deglon, L. Jones, M. Peschanski, N.D. Allen, A.L. Perrier, Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells, *Hum. Mol. Genet.* 21 (2012) 3883–3895.
 - [59] P. Langfelder, J.P. Cantle, D. Chatzopoulou, N. Wang, F. Gao, I. Al-Ramahi, X.H. Lu, E.M. Ramos, K. El-Zein, Y. Zhao, S. Deverasetty, A. Tebbe, C. Schaab, D.J. Lavery, D. Howland, S. Kwak, J. Botas, J.S. Aaronson, J. Rosinski, G. Coppola, S. Horvath, X.W. Yang, Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice, *Nat. Neurosci.* 19 (2016) 623–633.
 - [60] M.F. Beal, Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31 (1992) 119–130.
 - [61] S.E. Browne, Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 358–382.
 - [62] M. Damiano, L. Galvan, N. Deglon, E. Brouillet, Mitochondria in Huntington's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (2010) 52–61.
 - [63] J.M. Oliveira, Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum, *J. Neurochem.* 114 (2010) 1–12.
 - [64] A. Chandra, A. Johri, M.F. Beal, Prospects for neuroprotective therapies in prodromal Huntington's disease, *Mov. Disord.* 29 (2014) 285–293.
 - [65] P. Guedes-Dias, B.R. Pinho, T.R. Soares, J. de Proenca, M.R. Duchon, J.M. Oliveira, Mitochondrial dynamics and quality control in Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.* 90 (2016) 51–57.
 - [66] F. Mochel, R.G. Haller, Energy deficit in Huntington disease: why it matters, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 493–499.
 - [67] N. Brustovetsky, Mutant huntingtin and elusive defects in oxidative metabolism and mitochondrial calcium handling, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 2944–2953.
 - [68] Y.S. Choo, G.V. Johnson, M. MacDonald, P.J. Detloff, M. Lesort, Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 1407–1420.
 - [69] C.A. Gutekunst, S.H. Li, H. Yi, J.S. Mulroy, S. Kuemmerle, R. Jones, D. Rye, R.J. Ferrante, S.M. Hersch, X.J. Li, Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology, *J. Neurosci.* 19 (1999) 2522–2534.
 - [70] A.V. Panov, J.R. Burke, W.J. Strittmatter, J.T. Greenamyre, In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca²⁺-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 410 (2003) 1–6.
 - [71] A.V. Panov, C.A. Gutekunst, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, J.R. Burke, W.J. Strittmatter, J.T. Greenamyre, Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines, *Nat. Neurosci.* 5 (2002) 731–736.
 - [72] O. Barel, Z. Shorer, H. Flusser, R. Ofir, G. Narkis, G. Finer, H. Shalev, A. Nasasra, A. Saada, O.S. Birk, Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ, *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 1211–1216.
 - [73] T. Bourgeron, P. Rustin, D. Chretien, M. Birch-Machin, M. Bourgeois, E. Viegas-Pequignot, A. Munnich, A. Rotig, Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency, *Nat. Genet.* 11 (1995) 144–149.
 - [74] D. Ghezzi, P. Goffrini, G. Uziel, R. Horvath, T. Klopstock, H. Lochmuller, P. D'Adamo, P. Gasparini, T.M. Strom, H. Prokisch, F. Invernizzi, I. Ferrero, M. Zeviani, SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy, *Nat. Genet.* 41 (2009) 654–656.
 - [75] D. Ghezzi, C. Viscomi, A. Ferlini, F. Gualandi, P. Mereghetti, D. DeGrandis, M. Zeviani, Paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia is caused by mutations of the MR-1 mitochondrial targeting sequence, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 1058–1064.
 - [76] F. He, S. Zhang, F. Qian, C. Zhang, Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid), *Neurology* 45 (1995) 2178–2183.
 - [77] A.C. Ludolph, F. He, P.S. Spencer, J. Hammerstad, M. Sabri, 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin, *Can.*

- J. Neurol. Sci. 18 (1991) 492–498.
- [78] M.F. Beal, E. Brouillet, B.G. Jenkins, R.J. Ferrante, N.W. Kowall, J.M. Miller, E. Storey, R. Srivastava, B.R. Rosen, B.T. Hyman, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, *J. Neurosci.* 13 (1993) 4181–4192.
- [79] E. Brouillet, B.G. Jenkins, B.T. Hyman, R.J. Ferrante, N.W. Kowall, R. Srivastava, D.S. Roy, B.R. Rosen, M.F. Beal, Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, *J. Neurochem.* 60 (1993) 356–359.
- [80] E. Brouillet, P. Hantraye, R.J. Ferrante, R. Dolan, A. Leroy-Willig, N.W. Kowall, M.F. Beal, Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7105–7109.
- [81] E. Brouillet, F. Conde, M.F. Beal, P. Hantraye, Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals, *Prog. Neurobiol.* 59 (1999) 427–468.
- [82] E. Brouillet, C. Jacquard, N. Bizat, D. Blum, 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease, *J. Neurochem.* 95 (2005) 1521–1540.
- [83] J.M. Lee, E.V. Ivanova, I.S. Seong, T. Cashorali, I. Kohane, J.F. Gusella, M.E. MacDonald, Unbiased gene expression analysis implicates the huntingtin polyglutamine tract in extra-mitochondrial energy metabolism, *PLoS Genet.* 3 (2007) e135.
- [84] A.D. Strand, Z.C. Baquet, A.K. Aragaki, P. Holmans, L. Yang, C. Cleren, M.F. Beal, L. Jones, C. Kooperberg, J.M. Olson, K.R. Jones, Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration, *J. Neurosci.* 27 (2007) 11758–11768.
- [85] W.A. Brennan Jr., E.D. Bird, J.R. Aprille, Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain, *J. Neurochem.* 44 (1985) 1948–1950.
- [86] S.E. Browne, A.C. Bowling, U. MacGarvey, M.J. Baik, S.C. Berger, M.M. Muqit, E.D. Bird, M.F. Beal, Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 646–653.
- [87] J. Butterworth, C.M. Yates, G.P. Reynolds, Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases, *J. Neurol. Sci.* 67 (1985) 161–171.
- [88] M. Gu, M.T. Gash, V.M. Mann, F. Javoy-Agid, J.M. Cooper, A.H. Schapira, Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus, *Ann. Neurol.* 39 (1996) 385–389.
- [89] V.M. Mann, J.M. Cooper, F. Javoy-Agid, Y. Agid, P. Jenner, A.H. Schapira, Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease, *Lancet* 336 (1990) 749.
- [90] A. Benchoua, Y. Trioulier, D. Zala, M.C. Gaillard, N. Lefort, N. Dufour, F. Saudou, J.M. Elalouf, E. Hirsch, P. Hantraye, N. Deglon, E. Brouillet, Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 1652–1663.
- [91] A. Kuhn, D.R. Goldstein, A. Hodges, A.D. Strand, T. Sengstad, C. Kooperberg, K. Becanovic, M.A. Pouladi, K. Sathasivam, J.H. Cha, A.J. Hannan, M.R. Hayden, B.R. Leavitt, S.B. Dunnett, R.J. Ferrante, R. Albin, P. Shelbourne, M. Delorenzi, S.J. Augood, R.L. Faull, J.M. Olson, G.P. Bates, L. Jones, R. Luthi-Carter, Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 1845–1861.
- [92] S.J. Tabrizi, M.W. Cleeter, J. Xuereb, J.W. Taanman, J.M. Cooper, A.H. Schapira, Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain, *Ann. Neurol.* 45 (1999) 25–32.
- [93] M.A. Sorolla, G. Reverter-Branchat, J. Tamarit, I. Ferrer, J. Ros, E. Cabiscol, Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 667–678.
- [94] S. Sorbi, E.D. Bird, J.P. Blass, Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain, *Ann. Neurol.* 13 (1983) 72–78.
- [95] P. Guidetti, V. Charles, E.Y. Chen, P.H. Reddy, J.H. Kordower, W.O. Whetsell Jr., R. Schwarcz, D.A. Tagle, Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production, *Exp. Neurol.* 169 (2001) 340–350.
- [96] A. Zourlidou, T. Gidalevitz, M. Kristiansen, C. Landles, B. Woodman, D.J. Wells, D.S. Latchman, J. de Bellerche, S.J. Tabrizi, R.I. Morimoto, G.P. Bates, Hsp27 overexpression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: chronic neurodegeneration does not induce Hsp27 activation, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 1078–1090.
- [97] M. Perluigi, H.F. Poon, W. Maragos, W.M. Pierce, J.B. Klein, V. Calabrese, C. Cini, C. De Marco, D.A. Butterfield, Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease, *Mol. Cell Proteomics* 4 (2005) 1849–1861.
- [98] C. Zabel, L. Mao, B. Woodman, M. Rohe, M.A. Wacker, Y. Klare, A. Koppelstatter, G. Nebrich, O. Klein, S. Grams, A. Strand, R. Luthi-Carter, D. Hartl, J. Klose, G.P. Bates, A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for huntington disease, *Mol. Cell Proteomics* 8 (2009) 720–734.
- [99] M. Damiano, E. Diguët, C. Malmgren, M. D'Aurelio, L. Galvan, F. Petit, L. Benhaim, M. Guillermier, D. Houitte, N. Dufour, P. Hantraye, J.M. Canals, J. Alberch, T. Delzescaux, N. Deglon, M.F. Beal, E. Brouillet, A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 3869–3882.
- [100] E.A. Thomas, G. Coppola, B. Tang, A. Kuhn, S. Kim, D.H. Geschwind, T.B. Brown, R. Luthi-Carter, M.E. Ehrlich, In vivo cell-autonomous transcriptional abnormalities revealed in mice expressing mutant huntingtin in striatal but not cortical neurons, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 1049–1060.
- [101] A. Benchoua, Y. Trioulier, E. Diguët, C. Malmgren, M.C. Gaillard, N. Dufour, J.M. Elalouf, S. Krajewski, P. Hantraye, N. Deglon, E. Brouillet, Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 1446–1456.
- [102] P. Majumder, S. Raychaudhuri, B. Chattopadhyay, N.P. Bhattacharyya, Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range, *Cell Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 1127–1145.
- [103] A. Solans, A. Zambrano, M. Rodriguez, A. Barrientos, Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 3063–3081.
- [104] J. Hamilton, J.J. Pellman, T. Brustovetsky, R.A. Harris, N. Brustovetsky, Oxidative metabolism and Ca²⁺ handling in isolated brain mitochondria and striatal neurons from R6/2 mice, a model of Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* (2016).
- [105] A.L. Orr, S. Li, C.E. Wang, H. Li, J. Wang, J. Rong, X. Xu, P.G. Mastroberardino, J.T. Greenamyre, X.J. Li, N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking, *J. Neurosci.* 28 (2008) 2783–2792.
- [106] J. Hamilton, J.J. Pellman, T. Brustovetsky, R.A. Harris, N. Brustovetsky, Oxidative metabolism in YAC128 mouse model of Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 4862–4878.
- [107] L. Naia, I.L. Ferreira, T. Cunha-Oliveira, A.I. Duarte, M. Ribeiro, T.R. Rosenstock, M.N. Laco, M.J. Ribeiro, C.R. Oliveira, F. Saudou, S. Humbert, A.C. Rego, Activation of IGF-1 and insulin signaling pathways ameliorate mitochondrial function and energy metabolism in Huntington's Disease human lymphoblasts, *Mol. Neurobiol.* 51 (2015) 331–348.
- [108] L. Naia, M. Ribeiro, J. Rodrigues, A.I. Duarte, C. Lopes, T.R. Rosenstock, M.R. Hayden, A.C. Rego, Insulin and IGF-1 regularize energy metabolites in neural cells expressing full-length mutant huntingtin, *Neuropeptides* 58 (2016) 73–81.
- [109] F. Mochel, B. Durant, X. Meng, J. O'Callaghan, H. Yu, E. Brouillet, V.C. Wheeler, S. Humbert, R. Schiffmann, A. Durr, Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 1361–1370.
- [110] A. Sawa, G.W. Wiegand, J. Cooper, R.L. Margolis, A.H. Sharp, J.F. Lawler Jr., J.T. Greenamyre, S.H. Snyder, C.A. Ross, Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization, *Nat. Med.* 5 (1999) 1194–1198.
- [111] I. Ventura, M.T. Russo, C. De Nuccio, G. De Luca, P. Degan, A. Bernardo, S. Visentin, L. Minghetti, M. Bignami, hMTH1 expression protects mitochondria from Huntington's disease-like impairment, *Neurobiol. Dis.* 49 (2013) 148–158.
- [112] X. Guo, X. Sun, D. Hu, Y.J. Wang, H. Fujioka, R. Vyas, S. Chakrapani, A.U. Joshi, Y. Luo, D. Mochly-Rosen, X. Qi, VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12646.
- [113] R.A. Quintanilla, Y.N. Jin, R. von Bernhardi, G.V. Johnson, Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease, *Mol. Neurodegener.* 8 (2013) 45.
- [114] F.N. Gellerich, Z. Gizatullina, H.P. Nguyen, S. Trumbeckaite, S. Vielhaber, E. Seppet, S. Zierz, B. Landwehrmeyer, O. Riess, S. von Horsten, F. Striggow, Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca²⁺ in transgenic Huntington disease rats, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 30715–30724.
- [115] Q. Ruan, M. Lesort, M.E. MacDonald, G.V. Johnson, Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 669–681.
- [116] E. Rockabrand, N. Slepko, A. Pantalone, V.N. Nukala, A. Kazantsev, J.L. Marsh, P.G. Sullivan, J.S. Steffan, S.L. Sensi, L.M. Thompson, The first 17 amino acids of huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 61–77.
- [117] B.I. Bae, H. Xu, S. Igarashi, M. Fujimuro, N. Agrawal, Y. Taya, S.D. Hayward, T.H. Moran, C. Montell, C.A. Ross, S.H. Snyder, A. Sawa, p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease, *Neuron* 47 (2005) 29–41.
- [118] E. Bossy-Wetzel, R. Schwarzenbacher, S.A. Lipton, Molecular pathways to neurodegeneration, *Nat. Med.* 10 (Suppl) (2004) S2–S9.
- [119] T. Milakovic, R.A. Quintanilla, G.V. Johnson, Mutant huntingtin expression induces mitochondrial calcium handling defects in clonal striatal cells: functional consequences, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 34785–34795.
- [120] N. Brustovetsky, R. LaFrance, K.J. Purl, T. Brustovetsky, C.D. Keene, W.C. Low, J.M. Dubinsky, Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's Disease, *J. Neurochem.* 93

- (2005) 1361–1370.
- [121] J.Q. Wang, Q. Chen, X. Wang, Q.C. Wang, Y. Wang, H.P. Cheng, C. Guo, Q. Sun, Q. Chen, T.S. Tang, Dysregulation of mitochondrial calcium signaling and superoxide flashes cause mitochondrial genomic DNA damage in Huntington disease, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 3070–3084.
 - [122] E. Bossy-Wetzel, A. Petrilli, A.B. Knott, Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction, *Trends Neurosci.* 31 (2008) 609–616.
 - [123] D.T. Chang, G.L. Rintoul, S. Pandipati, I.J. Reynolds, Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons, *Neurobiol. Dis.* 22 (2006) 388–400.
 - [124] W. Song, J. Chen, A. Petrilli, G. Liot, E. Klinglmayr, Y. Zhou, P. Poquiz, J. Tjong, M.A. Pouladi, M.R. Hayden, E. Masliah, M. Ellisman, I. Rouiller, R. Schwarzenbacher, B. Bossy, G. Perkins, E. Bossy-Wetzel, Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity, *Nat. Med.* 17 (2011) 377–382.
 - [125] U.P. Shirendeb, M.J. Calkins, M. Manczak, V. Anekonda, B. Dufour, J.L. McBride, P. Mao, P.H. Reddy, Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* 21 (2012) 406–420.
 - [126] G. Liot, B. Bossy, S. Lubitz, Y. Kushnareva, N. Sejbuk, E. Bossy-Wetzel, Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 899–909.
 - [127] F. Haun, T. Nakamura, A.D. Shiu, D.H. Cho, T. Tsunemi, E.A. Holland, A.R. La Spada, S.A. Lipton, S-nitrosylation of dynamin-related protein 1 mediates mutant huntingtin-induced mitochondrial fragmentation and neuronal injury in Huntington's disease, *Antioxid. Redox Signal* 19 (2013) 1173–1184.
 - [128] Y.N. Jin, Y.V. Yu, S. Gundemir, C. Jo, M. Cui, K. Tieu, G.V. Johnson, Impaired mitochondrial dynamics and Nrf2 signaling contribute to compromised responses to oxidative stress in striatal cells expressing full-length mutant huntingtin, *PLoS One* 8 (2013) e57932.
 - [129] U. Shirendeb, A.P. Reddy, M. Manczak, M.J. Calkins, P. Mao, D.A. Tagle, P.H. Reddy, Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 1438–1455.
 - [130] X. Guo, M.H. Disatnik, M. Monbureau, M. Shamlou, D. Mochly-Rosen, X. Qi, Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 5371–5388.
 - [131] M. Cherubini, M. Puigdeliliv, J. Alberch, S. Gines, Cdk5-mediated mitochondrial fission: a key player in dopaminergic toxicity in Huntington's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1852 (2015) 2145–2160.
 - [132] J.K. McGill, M.F. Beal, PGC-1 α , a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell* 127 (2006) 465–468.
 - [133] L. Cui, H. Jeong, F. Borovecki, C.N. Parkhurst, N. Tanese, D. Krainc, Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration, *Cell* 127 (2006) 59–69.
 - [134] J. Lin, P.H. Wu, P.T. Tarr, K.S. Lindenberg, J. St-Pierre, C.Y. Zhang, V.K. Motha, S. Jager, C.R. Vianna, R.M. Reznick, L. Cui, M. Manieri, M.X. Donovan, Z. Wu, M.P. Cooper, M.C. Fan, L.M. Rohas, A.M. Zavacki, S. Cinti, G.I. Shulman, B.B. Lowell, D. Krainc, B.M. Spiegelman, Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice, *Cell* 119 (2004) 121–135.
 - [135] R.C. Scarpulla, Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells, *J. Cell Biochem.* 97 (2006) 673–683.
 - [136] R.C. Scarpulla, Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 611–638.
 - [137] A.S. Dickey, V.V. Pineda, T. Tsunemi, P.P. Liu, H.C. Miranda, S.K. Gilmore-Hall, N. Lomas, K.R. Sampat, A. Buttgerit, M.J. Torres, A.L. Flores, M. Arreola, N. Arbez, S.S. Akimov, T. Gaasterland, E.R. Lazrowski, C.A. Ross, G.W. Yeo, B.L. Sopher, G.K. Magnuson, A.B. Pinkerton, E. Masliah, A.R. La Spada, PPAR- δ is repressed in Huntington's disease, is required for normal neuronal function and can be targeted therapeutically, *Nat. Med.* 22 (2016) 37–45.
 - [138] J. Jin, J. Albertz, Z. Guo, Q. Peng, G. Rudow, J.C. Troncoso, C.A. Ross, W. Duan, Neuroprotective effects of PPAR- γ agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease, *J. Neurochem.* 125 (2013) 410–419.
 - [139] M.C. Chiang, C.M. Chen, M.R. Lee, H.W. Chen, H.M. Chen, Y.S. Wu, C.H. Hung, J.J. Kang, C.P. Chang, C. Chang, Y.R. Wu, Y.S. Tsai, Y. Chern, Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 4043–4058.
 - [140] A. Chandra, A. Sharma, N.Y. Calingasan, J.M. White, Y. Shurubor, X.W. Yang, M.F. Beal, A. Johri, Enhanced mitochondrial biogenesis ameliorates disease phenotype in a full-length mouse model of Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* (2016).
 - [141] H. Yano, S.V. Baranov, O.V. Baranova, J. Kim, Y. Pan, S. Yablonska, D.L. Carlisle, R.J. Ferrante, A.H. Kim, R.M. Friedlander, Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin, *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 822–831.
 - [142] M. Komatsu, S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice, *Nature* 441 (2006) 880–884.
 - [143] P.K. Kamat, A. Kalani, P. Kyles, S.C. Tyagi, N. Tyagi, Autophagy of mitochondria: a promising therapeutic target for neurodegenerative disease, *Cell Biochem. Biophys.* 70 (2014) 707–719.
 - [144] M. Martinez-Vicente, Z. Tallocczy, E. Wong, G. Tang, H. Koga, S. Kaushik, R. de Vries, E. Arias, S. Harris, D. Sulzer, A.M. Cuervo, Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease, *Nat. Neurosci.* 13 (2010) 567–576.
 - [145] B. Khalil, N. El Fissi, A. Aouane, M.J. Cabirol-Pol, T. Rival, J.C. Lievens, PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1617.
 - [146] Y.C. Wong, E.L. Holzbaur, The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation, *J. Neurosci.* 34 (2014) 1293–1305.
 - [147] S. Hwang, M.H. Disatnik, D. Mochly-Rosen, Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease, *EMBO Mol. Med.* 7 (2015) 1307–1326.
 - [148] J.M. Oliveira, S. Chen, S. Almeida, R. Riley, J. Goncalves, C.R. Oliveira, M.R. Hayden, D.G. Nicholls, L.M. Ellerby, A.C. Rego, Mitochondrial-dependent Ca²⁺ handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors, *J. Neurosci.* 26 (2006) 11174–11186.
 - [149] C. Jacquard, Y. Trioulier, F. Cosker, C. Escartin, N. Bizat, P. Hantraye, J.M. Cancela, G. Bonvento, E. Brouillet, Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation, *Faseb J.* 20 (2006) 1021–1023.
 - [150] J.R. Simpson, O. Isacson, Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA-mediated neuronal death in the striatum, *Exp. Neurol.* 121 (1993) 57–64.
 - [151] I. Bezprozvanny, Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, calcium signalling and Huntington's disease, *Subcell. Biochem.* 45 (2007) 323–335.
 - [152] S.E. Browne, M.F. Beal, Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis, *Antioxid. Redox Signal* 8 (2006) 2061–2073.
 - [153] B.G. Jenkins, W.J. Koroshetz, M.F. Beal, B.R. Rosen, Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy, *Neurology* 43 (1993) 2689–2695.
 - [154] B.G. Jenkins, H.D. Rosas, Y.C. Chen, T. Makabe, R. Myers, M. MacDonald, B.R. Rosen, M.F. Beal, W.J. Koroshetz, ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers, *Neurology* 50 (1998) 1357–1365.
 - [155] W.J. Koroshetz, B.G. Jenkins, B.R. Rosen, M.F. Beal, Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 160–165.
 - [156] C. Dautry, F. Conde, E. Brouillet, V. Mittoux, M.F. Beal, G. Bloch, P. Hantraye, Serial ¹H-NMR spectroscopy study of metabolic impairment in primates chronically treated with the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid, *Neurobiol. Dis.* 6 (1999) 259–268.
 - [157] C. Dautry, F. Vaufray, E. Brouillet, N. Bizat, P.G. Henry, F. Conde, G. Bloch, P. Hantraye, Early N-acetylaspargate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 20 (2000) 789–799.
 - [158] P.G. Henry, V. Lebon, F. Vaufray, E. Brouillet, P. Hantraye, G. Bloch, Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo ¹H-¹³C NMR spectroscopy, *J. Neurochem.* 82 (2002) 857–866.
 - [159] B.G. Jenkins, E. Brouillet, Y.C. Chen, E. Storey, J.B. Schulz, P. Kirschner, M.F. Beal, B.R. Rosen, Non-invasive neurochemical analysis of focal excitotoxic lesions in models of neurodegenerative illness using spectroscopic imaging, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 16 (1996) 450–461.
 - [160] A. Sturrock, C. Laule, J. Decolongon, R. Dar Santos, A.J. Coleman, S. Creighton, N. Bechtel, R. Reilmann, M.R. Hayden, S.J. Tabrizi, A.L. Mackay, B.R. Leavitt, Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in premanifest and early Huntington disease, *Neurology* 75 (2010) 1702–1710.
 - [161] S.J. van den Bogaard, E.M. Dumas, W.M. Teeuwisse, H.E. Kan, A. Webb, R.A. Roos, J. van der Grond, Exploratory 7-Tesla magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease provides in vivo evidence for impaired energy metabolism, *J. Neurol.* 258 (2011) 2230–2239.
 - [162] S.J. van den Bogaard, E.M. Dumas, W.M. Teeuwisse, H.E. Kan, A. Webb, M.A. van Buchem, R.A. Roos, J. van der Grond, Longitudinal metabolite changes in Huntington's disease during disease onset, *J. Huntingt. Dis.* 3 (2014) 377–386.
 - [163] I. Tkac, P.G. Henry, L. Zacharoff, M. Wedel, W. Gong, D.K. Deelchand, T. Li, J.M. Dubinsky, Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 32 (2012) 1977–1988.
 - [164] B.G. Jenkins, P. Klivenyi, E. Kustermann, O.A. Andreassen, R.J. Ferrante, B.R. Rosen, M.F. Beal, 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, *J. Neurochem.* 74 (2000) 2108–2119.
 - [165] J. Pepin, L. Francelle, M.A. Carrillo-de Sauvage, L. de Longprez, P. Giphcstein, K. Cambon, J. Valette, E. Brouillet, J. Flament, In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease, *Neuroimage* 139 (2016) 53–64.
 - [166] I. Tkac, J.M. Dubinsky, C.D. Keene, R. Gruetter, W.C. Low, Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo ¹H NMR spectroscopy, *J. Neurochem.* 100 (2007) 1397–1406.
 - [167] B.G. Jenkins, O.A. Andreassen, A. Dedeoglu, B. Leavitt, M. Hayden, D. Borchelt, C.A. Ross, R.J. Ferrante, M.F. Beal, 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, *J. Neurochem.* 95 (2005) 553–562.
- [168] T. Heikkinen, K. Lehtimäki, N. Vartiainen, J. Puolivali, S.J. Hendricks, J.R. Glaser, A. Bradaia, K. Wadel, C. Touller, O. Kontkanen, J.M. Yrjanheikki, B. Buisson, D. Howland, V. Beaumont, I. Munoz-Sanjuan, L.C. Park, Characterization of neurophysiological and behavioral changes, MRI brain volumetry and 1H MRS in zQ175 knock-in mouse model of Huntington's disease, *PLoS One* 7 (2012) e50717.
- [169] Q. Peng, B. Wu, M. Jiang, J. Jin, Z. Hou, J. Zheng, J. Zhang, W. Duan, Characterization of behavioral, neuropathological, brain metabolic and key molecular changes in zQ175 knock-in mouse model of Huntington's disease, *PLoS One* 11 (2016) e0148839.
- [170] S.S. Gill, R.K. Small, D.G. Thomas, P. Patel, R. Porteous, N. Van Bruggen, D.G. Gadian, R.A. Kauppinen, S.R. Williams, Brain metabolites as 1H NMR markers of neuronal and glial disorders, *NMR Biomed.* 2 (1989) 196–200.
- [171] O.A. Petroff, L. Pleban, J.W. Prichard, Metabolic assessment of a neuron-enriched fraction of rat cerebrum using high-resolution 1H and 13C NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Med.* 30 (1993) 559–567.
- [172] M.L. Simmons, C.G. Frondoza, J.T. Coyle, Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies, *Neuroscience* 45 (1991) 37–45.
- [173] L. Zacharoff, I. Tkac, Q. Song, C. Tang, P.J. Bolan, S. Mangia, P.G. Henry, T. Li, J.M. Dubinsky, Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 32 (2012) 502–514.
- [174] S. Wolff, R. Balaban, NMR imaging of labile proton exchange, *J. Magnetic Reson.* 86 (1990) 164–169.
- [175] K. Cai, M. Haris, A. Singh, F. Kogan, J.H. Greenberg, H. Hariharan, J.A. Detre, R. Reddy, Magnetic resonance imaging of glutamate, *Nat. Med.* 18 (2012) 302–306.
- [176] M.A. Carrillo-de Sauvage, J. Flament, Y. Bramoulle, L. Ben Haim, M. Guillermier, A. Berniard, G. Auregan, D. Houitte, E. Brouillet, G. Bonvento, P. Hantraye, J. Valette, C. Escartin, The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an in vivo multimodal magnetic resonance imaging study, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 35 (2015) 917–921.
- [177] K.A. Davis, R.P. Nanga, S. Das, S.H. Chen, P.N. Hadar, J.R. Pollard, T.H. Lucas, R.T. Shinohara, B. Litt, H. Hariharan, M.A. Elliott, J.A. Detre, R. Reddy, Glutamate imaging (GluCEST) lateralizes epileptic foci in nonlesional temporal lobe epilepsy, *Sci. Transl. Med.* 7 (2015) 309ra161.
- [178] T.Q. Hoang, S. Bluml, D.J. Dubowitz, R. Moats, O. Kopyov, D. Jacques, B.D. Ross, Quantitative proton-decoupled 31P MRS and 1H MRS in the evaluation of Huntington's and Parkinson's diseases, *Neurology* 50 (1998) 1033–1040.
- [179] R. Lodi, A.H. Schapira, D. Manners, P. Styles, N.W. Wood, D.J. Taylor, T.T. Warner, Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy, *Ann. Neurol.* 48 (2000) 72–76.
- [180] C. Saft, J. Zange, J. Andrich, K. Muller, K. Lindenberg, B. Landwehrmeyer, M. Vorgerd, P.H. Kraus, H. Przuntek, L. Schols, Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease, *Mov. Disord.* 20 (2005) 674–679.
- [181] F. Mochel, T.M. N'Guyen, D. Deelchand, D. Rinaldi, R. Valabregue, C. Wary, P.G. Carlier, A. Durr, P.G. Henry, Abnormal response to cortical activation in early stages of Huntington disease, *Mov. Disord.* 27 (2012) 907–910.
- [182] I.M. Adanyeguh, D. Rinaldi, P.G. Henry, S. Cailliet, R. Valabregue, A. Durr, F. Mochel, Triheptanoin improves brain energy metabolism in patients with Huntington disease, *Neurology* 84 (2015) 490–495.
- [183] B. Tiret, M.-A. Carrillo-de Sauvage, H.P. Nguyen, N. El Massioui, V. Doyère, V. Lebon, E. Brouillet, J. Valette, Remodeling of Energy Metabolism Revealed by 31P Magnetization Transfer in a Transgenic Rat Model of Huntington's Disease, *ISMRM*, Singapore, 2016.
- [184] F. Mochel, S. Duteil, C. Marelli, C. Jauffret, A. Barles, J. Holm, L. Sweetman, J.F. Benoist, D. Rabier, P.G. Carlier, A. Durr, Dietary anaplerotic therapy improves peripheral tissue energy metabolism in patients with Huntington's disease, *Eur. J. Hum. Genet.* 18 (2010) 1057–1060.
- [185] A. Polyzos, A. Holt, C. Brown, C. Cosme, P. Wipf, A. Gomez-Marin, M.R. Castro, S. Ayala-Pena, C.T. McMurray, Mitochondrial targeting of XJB-5-131 attenuates or improves pathophysiology in HdhQ150 animals with well-developed disease phenotypes, *Hum. Mol. Genet.* 25 (2016) 1792–1802.
- [186] X. Yin, M. Manczak, P.H. Reddy, Mitochondria-targeted molecules MitoQ and SS31 reduce mutant huntingtin-induced mitochondrial toxicity and synaptic damage in Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* 25 (2016) 1739–1753.
- [187] L.E. Clemens, J.J. Weber, T.T. Wlodkowski, L. Yu-Taeger, M. Michaud, C. Calaminus, S.H. Eckert, J. Gaca, A. Weiss, J.C. Magg, E.K. Jansson, G.P. Eckert, B.J. Pichler, T. Bordet, R.M. Pruss, O. Riess, H.P. Nguyen, Olesoxime suppresses calpain activation and mutant huntingtin fragmentation in the BACHD rat, *Brain* 138 (2015) 3632–3653.
- [188] J. Eckmann, L.E. Clemens, S.H. Eckert, S. Hagl, L. Yu-Taeger, T. Bordet, R.M. Pruss, W.E. Muller, K. Leuner, H.P. Nguyen, G.P. Eckert, Mitochondrial membrane fluidity is consistently increased in different models of Huntington disease: restorative effects of olesoxime, *Mol. Neurobiol.* 50 (2014) 107–118.
- [189] V. Costa, M. Giacomello, R. Hudec, R. Lopreiato, G. Ermak, D. Lim, W. Malorni, K.J. Davies, E. Carafoli, L. Scorrano, Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli, *EMBO Mol. Med.* 2 (2010) 490–503.

Titre : Développement de l'imagerie métabolique par IRM-CEST : Application à la maladie de Huntington

Mots-Clés : CEST, IRM, Huntington, Imagerie médicale, Physique

Résumé :

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire qui affecte le cerveau. Cette maladie est caractérisée par des signes cliniques tels que la dépression, la démence ainsi que des troubles moteurs s'aggravant au fil du temps. Ces déficiences sont dues à une augmentation anormale de la taille des répétitions CAG dans le gène codant la protéine huntingtine. Celle-ci s'accumule dans les cellules cérébrales et entraîne leur mort. Des études antérieures ont démontré que le profil métabolique mesuré en spectroscopie RMN ^1H pouvait être altéré chez les patients atteints de cette maladie ainsi que des atrophies majeures de certaines structures du cerveau. Des hypothèses impliquant des défauts du métabolisme énergétique ont été avancées pour expliquer en partie la physiopathologie de la maladie. Les acteurs du métabolisme pourraient ainsi constituer des biomarqueurs d'intérêt. A l'aide d'une modalité d'IRM prometteuse appelée CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer : Transfert de Saturation par Echange Chimique) il est possible de détecter des protons labiles faiblement concentrés qui sont classiquement indétectables en IRM. Il devient ainsi possible de cartographier in vivo la distribution de métabolites comme le glutamate (qui est un neurotransmetteur) ou le glucose (qui est le carburant des cellules) qui sont potentiellement impliqués dans les maladies neurodégénératives. Les développements méthodologiques effectués lors de cette thèse ont ensuite été appliqués à des modèles de rongeurs de la maladie de Huntington (souris KI140, souris R6/1, rats BACHD) afin d'identifier les biomarqueurs potentiels de la pathologie et d'évaluer la pertinence de ces méthodes IRM innovantes. L'ensemble de ces résultats et des méthodes mises en place durant cette thèse montrent le potentiel de l'imagerie CEST pour l'étude des maladies neurodégénératives.

Title : Development of metabolic imaging using CEST-MRI: application to Huntington's disease

Keywords : CEST, MRI, Huntington, Medical imaging, Physics

Abstract :

Huntington's disease (HD) is a inherited neurodegenerative disease affecting the brain. This disease is characterized by clinical symptoms such as psychiatric, cognitive and motor disorders worsening over time. These deficiencies are due to an abnormal increase in the size of the CAG repeats in the gene encoding the huntingtin protein. This accumulates in the brain cells and causes their death. Previous studies have shown that the metabolic profile measured by ^1H NMR spectroscopy can be altered in patients with this disease as well as major atrophy of certain structures of the brain. Hypotheses involving defects in energy metabolism have been advanced to explain partially the pathophysiology of the disease. The metabolic actors could thus be biomarkers of interest. Using a promising MRI modality called Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST), it is possible to detect low-concentrated labile protons that are classically undetectable in MRI. It thus becomes possible to map in vivo the distribution of metabolites such as glutamate (which is a neurotransmitter) or glucose (which is the fuel of cells) which are potentially involved in neurodegenerative diseases. The methodological developments carried out during this thesis were then applied to rodent models of Huntington's disease (KI140 mice, R6/1 mice, BACHD rats) in order to identify potential biomarkers of the pathology and to evaluate the relevance of these innovative MRI methods. All of these results and methods implemented during this thesis show the potential of CEST imaging for the study of neurodegenerative diseases.