



HAL
open science

Spectroscopie RMN, des stratégies couramment utilisées en clinique vers les techniques de demain.

Leslie Mazuel

► **To cite this version:**

Leslie Mazuel. Spectroscopie RMN, des stratégies couramment utilisées en clinique vers les techniques de demain.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM12 . tel-01845995

HAL Id: tel-01845995

<https://theses.hal.science/tel-01845995>

Submitted on 20 Jul 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.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL – UNIVERSITÉ D'Auvergne

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité
Neurosciences

soutenue publiquement le 3 Septembre 2014
par

Leslie MAZUEL

*Spectroscopie RMN des stratégies
couramment utilisées en clinique vers
les techniques de demain*

Pr. Franck DURIF
Dr. Yannick CREMILLIEUX
Dr. Anne-Marie DELORT
Dr. Vincent LEBON
Dr. Jean-Marie BONNY
Dr. Betty JEAN

EA7280, Clermont-ferrand
CNRS, Bordeaux
CNRS, Clermont-ferrand
CEA, Fontenay-aux-roses
INRA, Clermont-ferrand
CHU, Clermont-ferrand

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Résumé du travail de thèse

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative du système cerveau central conduisant à l'apparition des troubles moteurs caractéristiques de la maladie : akinésie, rigidité et tremblement de repos. La perte des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée va conduire à des modifications biochimiques au niveau du putamen. Notamment, les travaux réalisés en électrophysiologie, microdialyse et spectroscopie par résonance magnétique (SRM) suggèrent une hyperactivité de la voie glutamatergique cortico-striatale associée à un changement du microenvironnement glial au niveau du putamen. Ces observations conduisent à penser à une adaptation du cycle glutamate-glutamine ayant lieu entre les neurones et les astrocytes en réponse à la perte neuronale.

Ainsi, dans ce travail de thèse, deux approches ont été développées afin de suivre par SRM les changements métaboliques impliqués dans la pathologie parkinsonienne, notamment les variations des concentrations en glutamate et glutamine dans le putamen.

Une première approche de la quantification des métabolites cérébraux par spectroscopie du ^1H , technique couramment utilisée en clinique, a été utilisée pour suivre l'évolution des métabolites d'intérêt chez des patients parkinsonien à jeun ou suite à la prise d'un traitement dopaminergique. Si cette étude a révélé des changements de concentrations en N-acétylaspartate, créatine et myo-inositol chez les patients parkinsoniens, aucun changement du métabolisme glutamatergique n'a pu être observé par cette technique peut-être à cause d'un manque de sensibilité de la technique pour discriminer les pools de glutamate et de glutamine.

De ce fait, une nouvelle approche de SRM du carbone ^{13}C a été développée pour le suivi du cycle glutamate-glutamine *in vivo*, c'est la polarisation dynamique nucléaire (PDN). De part la haute sensibilité de cette technique, il est désormais possible de suivre des voies métaboliques *in vivo* en temps réel. La mise en place et l'optimisation de la PDN pour le suivi du cycle glutamate-glutamine a été un des objectifs au cours de ce projet de thèse. Validée sur un groupe d'animaux contrôle, cette technique offre un avenir prometteur pour l'analyse de ce flux dans les pathologies neurodégénératives.

En conclusion, les stratégies diagnostiques en clinique par SRM du ^1H restent à l'heure actuelle peu sensibles pour l'études des modifications du cycle glutamate-glutamine *in vivo* chez l'homme. Les développements technologiques réalisés au cours de ce travail de thèse notamment avec la PDN du ^{13}C laissent entrevoir une nouvelle approche pour le suivi en temps réel de ce métabolisme cérébral. Si la PDN est principalement utilisée dans des études précliniques, la disponibilité de nouveaux systèmes cliniques pourrait permettre son avènement en tant que nouvelle stratégie de diagnostic en imagerie clinique.

Mots clés : Glutamate, Glutamine, spectroscopie RMN, proton, carbone ^{13}C , maladie de Parkinson

Summary

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by motor troubles such as akinesia, rigidity and tremor. The loss of dopaminergic neurons from the nigro-striatal pathway leads to biochemical changes inside the putamen. Especially, works on electrophysiology, micro dialysis and magnetic resonance spectroscopy (MRS) suggest a hyperactivity of the glutamatergic cortico-striatal pathway concomitant with glial microenvironment changes. These observations suggest a modification of the glutamate-glutamine cycle between neurons and astrocytes in response to the neuronal loss.

In this thesis work, 2 ways were developed in order to follow by MRS the metabolic changes occurring in Parkinson's disease. In particular, we want to follow the changes in glutamate-glutamine cycle inside the putamen.

In a first study, a ^1H MRS approach was used to assess the metabolic changes inside the putamen of Parkinson's disease without or under dopaminergic treatment. In this study, changes in N-acetylaspartate, creatine and myo-inositol were observed in parkinsonian patient, but no change in glutamatergic metabolism was observed. This could be due to the lack of sensitivity of the technique to differentiate glutamate and glutamine pools.

Thus, we choose to use a new ^{13}C MRS approach in order to follow dynamically *in vivo* the glutamate-glutamine cycle inside the brain: the Dynamic Nuclear Polarization (DNP). By the high sensitivity level of this technique it is now possible to follow the metabolic pathways *in vivo*, in real time. The implementation of DNP was assessed under a control group of animal. This technique offers a new promising tool for the flux analysis under pathologic conditions.

To conclude, the MRS strategies for clinical diagnosis remains poor sensitive for the study of glutamate-glutamine cycle *in vivo* in human. The development of DNP opens the door to a new strategy to assess in a real-time manner the changes in cerebral metabolism. Even if, DNP is currently mainly used in pre-clinical studies, the development of new clinical systems could allow its use as a new diagnostic strategy in clinical imaging.

Key words: Glutamate, Glutamine, NMR spectroscopy, proton, ^{13}C carbon, Parkinson's disease

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les Dr Yannick Cremillieux, Dr Anne-Marie Delort et le Dr Vincent Lebon d'avoir accepté d'être les rapporteurs scientifiques de cette thèse, ainsi que le Dr Jean-Marie BONNY et le Dr Betty Jean d'avoir accepté de la juger. Je leur suis très reconnaissante du temps et de l'énergie qu'ils ont consacré cette évaluation.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le Pr Franck Durif pour m'avoir accueilli dans son équipe. Je tiens à vous remercier pour tous vos conseils prodigués tout au long de ce travail de thèse. Je vous remercie de m'avoir permise de me lancer dans cette grande aventure qu'est la thèse.

Je tiens également à remercier Carine Chassain, pour tous ses conseils scientifiques et sa disponibilité au cours de mes années de thèse. Je retiendrais notamment nos grands moments de fous rire à l'IRM. TMTc, la journée du dentifrice restera gravée longtemps dans ma mémoire !!!!

Un grand merci à Betty Jean pour son enthousiasme sans failles malgré nos galères !

Je n'oublierais évidemment pas les « manip' » ! Merci pour tous les super moments passés à vos cotés. L'humour de Jocelyn Serange va sans aucun doute me manquer ! Je vous remercie également pour votre disponibilité et votre réactivité... « viiittee...un MANIP ».

Merci à mes co-bureautes, Ludivine et Amandine, pour votre soutien et tout nos moments de délire !

Mais tout cela n'aurait été possible sans le soutien inconditionnel de ma famille. Je remercie mes parents de m'avoir soutenue tout au long de ma scolarité... et elle commence à être longue ! Un grand merci à ma Mèl et mon dJo, mes deux canoux ! Enfin, merci à mon Sylvain, d'avoir été là durant ces années.

RESUME	2
REMERCIEMENTS	4
ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	13
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	17
AVANT-PROPOS	20
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	23
I. LA MALADIE DE PARKINSON.....	24
A. Etiologie et définition de la MP.....	24
1. Epidémiologie et étiologie.....	24
2. Neuropathologie de la maladie de Parkinson.....	25
3. Les symptômes cliniques.....	26
a) Symptômes moteurs.....	26
b) Symptômes non moteurs.....	27
B. Physiopathologie de la maladie de Parkinson.....	27
1. Organisation fonctionnelle des ganglions de la base.....	27
a) Anatomie des ganglions de la base.....	28
b) Organisation fonctionnelle.....	29
2. Système dopaminergique.....	32
a) La dopamine.....	32
(1) Histoire de sa découverte.....	32
(2) Synthèse et dégradation.....	33
b) Les voies dopaminergiques.....	34
3. Organisation fonctionnelle des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson.....	36
a) Le striatum : structure d'entrée des ganglions de la base.....	37
(1) La voie cortico-striatale glutamatergique.....	37
(2) Cycle glutamate-glutamine.....	39
(a) Découverte de l'existence du cycle glutamate-glutamine.....	39
(b) Métabolisme du cycle glutamate-glutamine.....	40

(3) Le cycle glutamate-glutamine dans les pathologies neurodégénératives.....	41
C. Traitements de la maladie de Parkinson	42
1. Les traitements pharmacologiques	43
a) L-dopa	43
b) Agonistes dopaminergiques	45
c) Inhibiteurs enzymatiques (IMAO-B et COMT).....	46
d) Autres molécules	47
2. Les traitements chirurgicaux	48
a) La chirurgie lésionnelle	48
b) La stimulation cérébrale profonde	49
c) Les techniques émergentes	50
D. Outils d'étude de la maladie de Parkinson	52
1. Modèles de la MP pour l'étude de la physiopathologie de la maladie.....	52
a) Les modèles neurotoxiques	52
(1) Lésion 6-OHDA.....	52
(2) Intoxication MPTP.....	54
b) Les modèles induits par les pesticides/herbicides.....	55
(1) Le paraquat	55
(2) La roténone.....	56
c) Modèles génétiques de la maladie	56
E. Outils de diagnostic de la maladie de Parkinson	57
1. Diagnostic de la maladie de Parkinson.....	57
a) Les échelles cliniques pour la pratique clinique courante	58
b) Evaluation in-vivo de la maladie grâce aux techniques d'imagerie	59
(1) SPECT	59
(2) Tomographie par Emission de Positrons (TEP)	59
(3) Imagerie et spectroscopie par résonance magnétique	60
II. IMAGERIE NON-INVASIVE DE LA MALADIE DE PARKINSON	62
A. La résonance magnétique nucléaire.....	62
B. La spectroscopie du proton	66
1. Généralités	66
2. Métabolites observables	67
3. Utilisation de la ¹ H MRS pour l'évaluation du métabolisme dans la maladie de Parkinson	69

C. Spectroscopie du ¹³C	71
1. Avantages et limitations... mais ça c'était avant !	71
2. Emergence d'une nouvelle technique de spectroscopie RMN pour la visualisation du métabolisme: l'hyperpolarisation du ¹³ C.....	72
a) Bases de l'hyperpolarisation du ¹³ C	72
(1) Principe	72
b) Les différentes techniques d'hyperpolarisation	74
(i) Polarisation induite par le para-hydrogène (PHIP)	74
(ii) Pompage optique.....	77
(iii) La Polarisation Dynamique Nucléaire (PDN).....	79
c) Séquences de SRM et d'imagerie du métabolisme pour la PDN.....	83
3. Application de la PDN pour la visualisation du métabolisme in-vivo	84
a) Le pyruvate hyperpolarisé	85
(1) Précurseur de choix	85
(2) Les études de PDN sur le métabolisme du pyruvate in-vivo.....	86
(3) Le premier essai clinique	87
b) Les autres précurseurs hyperpolarisés par PDN.....	89
4. A la recherche de nouveaux précurseurs d'intérêt en RMN pour la visualisation du métabolisme cérébral dans la maladie de Parkinson.....	90
a) Métabolites d'intérêts	90
(1) Le pyruvate	91
(2) L'AKG.....	93
(3) La glutamine	95
(4) Le glutamate	96
b) Challenge du passage de la BHE	96
(1) Découverte de la BHE	96
(2) Structure de la BHE.....	97
(3) Rôle de la BHE.....	98
(4) PDN, BHE et métabolisme	98

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

103

Article n°1: "¹H magnetic resonance spectroscopy for diagnosis and evaluation of treatment efficiency in Parkinson's disease.".....103

Article n°2: « Hyperpolarized ¹³C magnetic resonance imaging: a new-way to follow the glutamate-glutamine cycle *in vivo* in the brain »123

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	150
BIBLIOGRAPHIE	154
ANNEXES	172



Abréviations

Abréviations

AChE : Acetyl Choline Esterase

AKG : α -cétoglutarate

ATV : Aire Tegmentale Ventrale

BCAT : Branched Chain Amino transferase

CM : noyau Centro Median du thalamus

Cr : Créatine

DAT : Dopamine Transporteur

GABA : acide γ -aminobutyrique

GPC : Glycerophosphocholine

GPe : Globus Pallidus Externe

GPI : Globus Pallidus Interne

IDH : Isocitrate DesHydrogenase

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire

KIC : KétoIsoCaproate.

LRRK2 : Leucine Rich Repetition Kinase 2

LDH : Lactate DesHydrogénase

MAO : MonoAminine Oxidase

M-Ins : Myo-inositol

MPPP : 1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidine

MPTP : 1-méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydro pyridine

NAA : N-acetylaspartate

NC : Noyau Caudé

NET : Norépinephrine

NST : Noyau Sous Thalamique

PCh : Phosphocholine

PCr : Phosphocreatine

PDH : Pyruvate DesHydrogénase

PDN : Polarisation Dynamique Nucléaire

Pf : noyau Para-Fasciculaire du thalamus

PHIP : Polarisation Induite par le Para-Hydrogène

PPN : Noyau Pédonculo-Pontin

Pu : Putamen

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SNC : Système Nerveux Central

SNpc : Substance Noire Pars Compacta

SNr : Substance Noire pars Reticulata

SRM : Spectroscopie par Résonance Magnétique nucléaire

tCho : Glycerophosphocholine et phosphocholine

tCr : Creatine et phosphocréatine

TEP : Tomographie par Emission de Positrons

tNAA : N-acetylaspartateet N-acetylgutamate



Liste des figures

Liste des figures

Figure 1. Description de la maladie de Parkinson par James Parkinson en 1817.....	24
Figure 2. Photographie caractéristique d'un patient atteint de maladie de Parkinson.....	24
Figure 3. Mécanisme de la mort neuronale dans la maladie de Parkinson.....	26
Figure 4. Anatomie des ganglions de la base. Coupe coronale	28
Figure 5. Schéma du modèle classique d'organisation fonctionnelle des noyaux gris centraux.....	29
Figure 6. Le modèle classique « boîtes et flèches » des GB mis à jour.....	32
Figure 7. Synthèse de la dopamine.....	33
Figure 8. Catabolisme de la dopamine.	34
Figure 9. Les principales voies dopaminergiques.	35
Figure 10. Organisation fonctionnelle des NGC après dégénérescence nigro-striatale	36
Figure 11. Microscopie Electronique d'une synapse tripartite au niveau du striatum.....	38
Figure 12. Reconstruction 3D d'une synapse tripartite au niveau du striatum	38
Figure 13. Représentation d'une synapse glutamatergique.....	40
Figure 14. Le cycle glutamate-glutamine.....	41
Figure 15. Le "fauteuil trépidant" de Jean Martin Charcot pour le traitement de la maladie de Parkinson.	42
Figure 16. Markus Guggenheim (à gauche) en 1911 dans son laboratoire Roche Grenzäch.	43
Figure 17. Illustration de l'action de L-dopa dans le traitement de la maladie de Parkinson.	44
Figure 18. Relation entre le développement des dyskinésies dopa-induites et la concentration de L-dopa plasmatique.	44
Figure 19. Kit Duodopa®	45
Figure 20. Schéma récapitulatif des principaux traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson.	47
Figure 21. La stimulation cérébrale profonde chez le patient parkinsonien.	49
Figure 22. Lésion à la 6-OHDA.....	52
Figure 23. Mécanisme d'action de la 6-OHDA dans le cerveau.....	53
Figure 24. Mécanisme d'action du MPTP.....	54
Figure 25. Felix Bloch et Edward Mills Purcell, prix Nobel de physique en 1952 pour leurs travaux sur la RMN. 62	
Figure 26. Répartition de la population d'un système de spins $\frac{1}{2}$ après application du champ magnétique B_0 . 63	
Figure 27. Effet des impulsions RF sur le vecteur d'aimantation macroscopique.....	64
Figure 28. Effet des impulsions RF sur le vecteur d'aimantation macroscopique: représentation des spins..	64
Figure 29. Schéma récapitulatif des interactions entre les ondes RF et les spins placés dans un champ magnétique fixe B_0	65
Figure 30. Description du principe de l'hyperpolarisation.	73
Figure 31. Equation de Boltzmann.	73
Figure 32. Techniques d'hyperpolarisation utilisées in vivo.....	74
Figure 33. L'hyperpolarisation par PHIP.	75

Figure 34. Diagrammes décrivant la conversion de la polarisation du parahydrogène vers la molécule à polariser.....	75
Figure 35. Hyperpolarisation par ALTADENA et PASADENA.....	76
Figure 36. Visualisation des intermédiaires du cycle TCA in vivo après une injection de [1- ¹³ C] diéthyl succinate hyperpolarisé par PHIP	76
Figure 37. Hyperpolarisation PHIP SABRE.	77
Figure 38. Principe de la polarisation par pompage optique par POES.	78
Figure 39. Visualisation de bronchoconstriction et de la bronchodilatation des poumons par IRM suite à l'inhalation de Xexon hyperpolarisé.	78
Figure 40. Principe de la PDN.	79
Figure 41. Les principaux radicaux utilisés pour la PDN.	80
Figure 42. Le système de PDN suivi de dissolution.	81
Figure 43. Apport de l'hyperpolarisation 13C sur la qualité des spectres.....	81
Figure 44. Hyperpolarisation par PDN puis dissolution pour la visualisation du métabolisme in-vivo	82
Figure 45. Optimisation de la polarisation du [1- ¹³ C] acétate en fonction des concentrations en radical (OX063) et en ions lanthanides (Gadolinium, Gd ³⁺)	83
Figure 46. Voies impliquées dans le métabolisme du glutamate.	85
Figure 47. Premiers résultats de PDN obtenus dans le cerveau.....	86
Figure 48. Photo du polariseur SPINlab™ développé par General Electric et utilisé pour les applications cliniques chez l'Homme de la PDN.	88
Figure 49. Résultats obtenus pour la première étude de PDN réalisée chez l'Homme.....	88
Figure 50. Représentation du cycle TCA et des potentiels précurseurs pouvant être hyperpolarisés par afin de suivre in vivo de façon dynamique le cycle glutamate-glutamine.....	91
Figure 51. Spectre ¹³ C obtenus dans le cerveau du rat après injection de [2- ¹³ C] pyruvate hyperpolarisé.....	92
Figure 52. Représentation des métabolites du cycle TCA visibles dans le cerveau du rat après injection de [2- ¹³ C] pyruvate.....	92
Figure 53. Synthèse de l'AKG en glutamate via la glutamate deshydrogénase (GDH)	93
Figure 54. Hyperpolarisation du [1- ¹³ C] AKG et visualisation de son métabolisme in vivo.	94
Figure 55. Représentation empilée des spectres acquis in vitro dans une culture cellulaire de cellules tumorales non mutées pour le gène IDH1 (U87IDHwt).. ..	94
Figure 56. Métabolisme de la [5- ¹³ C] glutamine hyperpolarisée par PDN in vivo, chez le rat, dans une modèle de tumeur hépatique.....	95
Figure 57. Edwin Ellen Goldmann et la découverte de la barrière hémato-encéphalique.....	97
Figure 58. Structure de la BHE.....	98
Figure 59. Principe de la rupture de la BHE par injection d'une solution hyperosmolaire de mannitol 25%.....	99
Figure 60. Rupture transitoire de la BHE induite par les ultrasons.....	100
Figure 61. Détection du [1- ¹³ C] pyruvate et de ses métabolites dans une coupe passant par le cerveau de l'animal.	125

Figure 62. Détection du [1-¹³C] pyruvate et de ses métabolites dans le cerveau du rat sain grâce à une séquence de FIDCSI après l'injection du produit polarisé..... 125

Figure 63. Détection du [1-¹³C] pyruvate et de ses métabolites dans le cerveau du rat sain grâce à la séquence IDEAL à t=3s après l'injection du produit polarisé. 125

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des atomes ¹H, ¹³C, ¹⁵N pour l'étude en SRM. 66

Tableau 2. Principaux précurseurs hyperpolarisés par DNP et détectés in vivo 89

A series of vertical bars of varying heights and widths, mostly in shades of silver and grey, with one prominent red bar. They are positioned on the left side of the page, extending from the top to the bottom.

*Communications
scientifiques*

Ce travail de thèse à donné lieu à un ensemble de communications scientifiques citées ci-dessous :

Communications orales:

- **ESMRMB 2013**, Toulouse, France : *L-dopa restores the glutamate concentration in the putamen in Parkinson's disease : a ^1H magnetic resonance spectroscopy study.*
- **ESMRMB 2013**, Toulouse, France : *[$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate hyperpolarization for metabolism study in the rodent brain using magnetic resonance spectroscopy.*
- **JED 2013**, Clermont-ferrand, France : *Hyperpolarized ^{13}C and metabolic imaging.*

Communications affichées:

- **DNP symposium 2013**, Copenhague, Danemark : *[$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate hyperpolarization for metabolism study in the rodent brain using magnetic resonance spectroscopy.*
- **SFN 2013**, Lyon, France : *L-dopa restores the glutamate concentration in the putamen in Parkinson's disease : a 1H magnetic resonance spectroscopy study.*
- **COST 2014**, Zurich, Suisse : *[$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate hyperpolarization for metabolism study in the rodent brain using magnetic resonance spectroscopy*
- **FENS 2014**, Milan, Italie : *[$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate hyperpolarization for metabolism study in the rodent brain using magnetic resonance spectroscopy*

Article en cours de soumission sur le sujet (Annals of Neurology):

" ^1H magnetic resonance spectroscopy for diagnosis and evaluation of treatment efficiency in Parkinson's disease."

Article en cours de préparation sur le sujet (Nature communication):

« Hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging: a new-way to follow the glutamate-glutamine cycle in vivo in the brain »



Avant propos

Le travail qui suit a été mené dans le laboratoire EA7980 de l'Université d'Auvergne. Cette équipe s'intéresse à la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson par deux approches. Tout d'abord une approche comportementale est réalisée pour l'étude des troubles psychiatriques associés à la maladie de Parkinson. La seconde approche est réalisée en imagerie dans le but de rechercher des marqueurs de la maladie.

Ces dernières années, les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) se sont imposées comme des outils indispensables en clinique pour le diagnostic de pathologies cérébrales mais aussi en préclinique pour le suivi longitudinal de modèles animaux. En effet, la RMN est une technique doublement informative permettant l'analyse structurale d'un tissu grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) mais aussi moléculaire grâce à la spectroscopie par résonance magnétique (SRM). Profitant de la présence au centre d'imagerie IRM du CHU Gabriel Montpied à Clermont-Ferrand d'un aimant de 3T dédié à 50% à la recherche et 50% à la clinique couplé à un polariseur, nous allons dans ce travail chercher à identifier des marqueurs de la maladie par SRM du ^1H chez l'Homme et tenter de suivre des modifications métaboliques par ^{13}C SRM chez l'animal.

Ainsi, la partie bibliographique de ce manuscrit s'articule autour de deux axes: 1) la maladie de Parkinson, 2) la spectroscopie du ^1H et du ^{13}C .

Dans la première partie consacrée à la maladie de Parkinson, le premier chapitre abordera la définition de la maladie avec son épidémiologie et ses caractéristiques cliniques motrices et psychiques. Puis le second chapitre développera la physiopathologie de la maladie afin de comprendre les mécanismes mis-en-jeu dans l'apparition de cette pathologie. Les traitements existants de la maladie seront également décrits dans la troisième partie. Le chapitre 4 décrira les modèles animaux de la maladie utilisés pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la maladie et dans les troubles induits par la thérapie. Enfin, nous verrons dans le dernier chapitre de cette partie les outils de diagnostic de la maladie et l'intérêt de la SRM dans la recherche de marqueurs sensibles et spécifiques de la maladie.

La deuxième partie nous amène aux techniques de SRM existantes pour l'étude du métabolisme cérébral. Après un rappel du principe de la RMN, le second chapitre présentera la spectroscopie du ^1H . Cette technique étant cependant relativement informative, elle nous amènera à nous intéresser à la spectroscopie du ^{13}C . Bien que cette dernière soit peu sensible, le développement de nouvelles stratégies de polarisation ^{13}C permet une augmentation la capacité de détection de son signal. Ainsi, nous verrons les différentes techniques permettant la polarisation du ^{13}C . Nous focaliserons notamment notre attention sur la technique de polarisation dynamique nucléaire largement utilisée

pour suivre le métabolisme *in vivo*. Enfin, dans le dernier chapitre nous étudierons les stratégies de suivi du métabolisme cérébral dans la maladie de Parkinson grâce à cette technique.

La partie bibliographique sera suivie par la présentation des travaux scientifiques issus de ce projet de thèse puis d'une conclusion générale et des perspectives sur ce travail.



Revue bibliographique

Partie I



La maladie de Parkinson

I. La maladie de parkinson

A. Etiologie et définition de la MP

1. Epidémiologie et étiologie

La maladie de Parkinson est décrite pour la première fois au XIXème siècle par James Parkinson (1755-1824) (Figure 1), un médecin généraliste londonien, qui observa « des tremblements involontaires, avec une baisse de tonus musculaire, qui disparaissent lors d'une action, ainsi qu'une tendance à pencher le tronc vers l'avant » (Figure 2).

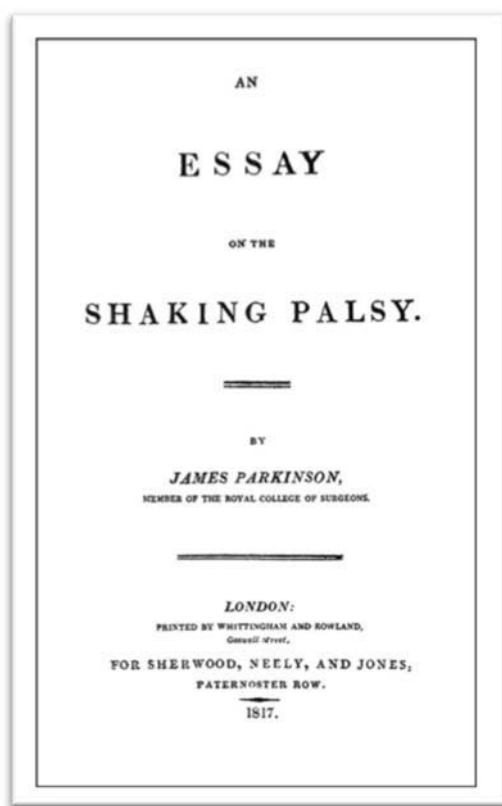


Figure 1. Description de la maladie de Parkinson par James Parkinson en 1817.

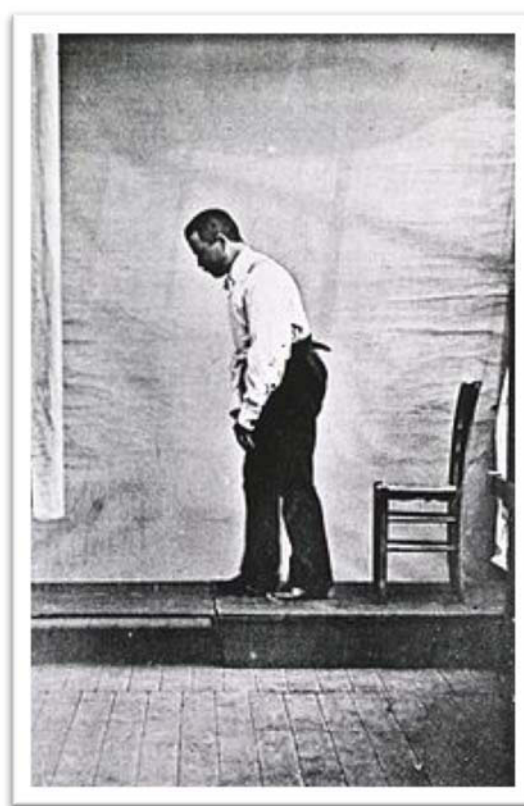


Figure 2. Photographie caractéristique d'un patient atteint de maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie du système nerveux central qui prend son origine avec la dégénérescence des neurones dopaminergiques d'une structure cérébrale profonde : la substance noire. Deuxième maladie neurodégénérative en termes de fréquence après la maladie d'Alzheimer, elle touche plus particulièrement les personnes âgées de plus de 60ans.

Si les causes de la maladie ne sont pas encore déterminées, des facteurs génétiques et environnementaux sembleraient être impliqués dans l'émergence de la pathologie.

- **Facteurs génétiques.** Des formes familiales de la maladie de Parkinson sont connues (duplication/triplication du gène de l' α -synucleine, mutations des gènes LRRK2, Parkin, PINK1, DJ-1 ou ATP13A2) cependant l'hétérogénéité tant génétique que clinique de cette maladie suggère une étiologie multifactorielle (pour revue : Spatola and Wider 2014).
- **Exposition aux pesticides.** Elle entraînerait une augmentation du risque de développer une maladie de Parkinson de l'ordre de 70% chez les personnes exposées (Ascherio et al. 2006). L'exposition combinée à différents pesticides multiplie ce risque par trois (Wang et al. 2011).
- **Autres facteurs de risques environnementaux.** Ils sont variés. Nous citerons par exemple le cas d'un excès de fer et de manganèse dans le régime alimentaire, ce qui tend à accélérer le processus d'oxydation et de la dégénérescence des cellules du cerveau impliquées dans la maladie de Parkinson, l'excès de radicaux libres dans le sang, une infection bactérienne ou virale ou encore l'exposition à des toxines (MPTP).

2. Neuropathologie de la maladie de Parkinson

Indépendamment des causes de la maladie, la pathogenèse de la maladie de Parkinson pourrait être associée à plusieurs mécanismes.

En effet, une des caractéristiques retrouvées dans la maladie de Parkinson est la présence d'agrégats protéiques intracellulaires dans les neurones dopaminergiques de la substance noire : les corps de Lewy, composés d' α -synucleine, d'ubiquitine ou encore de neurofilaments. L'accumulation de ces amas protéiques provoquerait la mort progressive de ces neurones par cytotoxicité (Kalia et al. 2013). Une autre hypothèse propose que la perte de neurones soit liée au stress oxydatif causé par un dysfonctionnement des mitochondries (Dauer and Przedborski 2003).

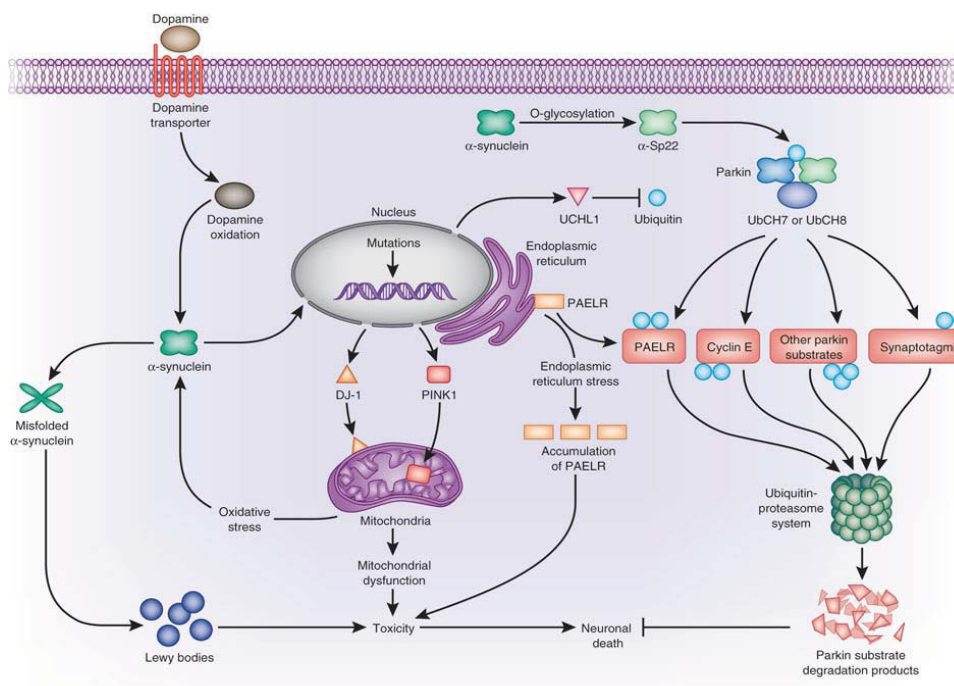


Figure 3. Mécanisme de la mort neuronale dans la maladie de Parkinson. La mort cellulaire des neurones dopaminergiques de la substance noire peut être due à différents mécanismes tels que l'agrégation d' α -synucléine, une dysfonction du système ubiquitine/protéasome ou une réduction de l'activité mitochondriale. Les mutations génétiques interviennent dans au moins un de ces mécanismes (Obeso et al. 2010).

En plus de ces deux phénomènes, l'excitotoxicité et la neuroinflammation sembleraient également impliquées dans la perte progressive des neurones dopaminergiques.

3. Les symptômes cliniques

a) Symptômes moteurs

Ainsi, la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire va conduire au développement des principaux symptômes moteurs de la maladie de Parkinson :

- **Tremblement de repos.** Unilatéral en début de maladie, le tremblement apparaît lors du relâchement musculaire (repos) et disparaît lors de la contraction musculaire volontaire. Ce symptôme est le principal motif de première consultation des patients. Il touche environ 70% des patients parkinsoniens.

- **Rigidité.** Elle correspond à une augmentation du tonus musculaire avec une résistance accrue lors de la mobilisation du segment atteint. Elle est responsable de plaintes telles que la raideur ou les douleurs.
- **Akinésie et bradykinésie.** L'akinésie correspond à des difficultés à initier le mouvement et la bradykinésie à un ralentissement et une réduction de l'amplitude des gestes. Ces symptômes touchent particulièrement les mouvements réclamant de la précision et les mouvements semi-automatiques, comme la marche ou l'écriture. L'exemple de l'écriture est emblématique dans la maladie de Parkinson : la micrographie est un symptôme souvent constaté et utilisé en complément du diagnostic de la maladie.
- **Instabilité posturale.**

b) Symptômes non moteurs

Considéré pendant longtemps comme une maladie uniquement motrice, les récentes avancées dans la compréhension et l'évaluation de la maladie de Parkinson ont mis en évidence des atteintes non motrices chez ces patients (Callesen et al. 2013). Notamment, des troubles neuropsychiatriques tels que l'anxiété, l'apathie, ou encore des troubles de l'impulsion conduisant à des conduites addictives ont été identifiés chez ces patients. Des troubles cognitifs sont également à noter dans la maladie.

B. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

1. Organisation fonctionnelle des ganglions de la base

Le système de ganglions de la base ou noyaux gris centraux regroupe des structures profondes reliées au cortex dont l'organisation en circuits parallèles et intégrés permet le traitement de l'information issue du cortex, sous l'influence modulatrice de la dopamine et d'autres neuromédiateurs. Les ganglions de la base jouent un rôle important dans le contrôle de la motricité, des mouvements volontaires et dans la préparation de l'action.

a) Anatomie des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont composés de différents noyaux :

- **Le striatum** : composé du noyau caudé (NC) et du putamen (Pu), il représente la structure d'entrée des ganglions de la base.
- **Le Globus Pallidus (GP)** : Situé médialement par rapport au Pu, le GP est divisé en 2 composantes : externe (GPe) et interne (GPI).
- **Le Noyau Sous Thalamique (NST).**
- **La Substance Noire (SN)** : divisée en 2 unités, pars reticulata (SNr) et pars compacta (SNpc). Cette dernière est composée de neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine (un dérivé de l'oxydation de la dopamine) donnant la couleur noire caractéristique de cette structure.

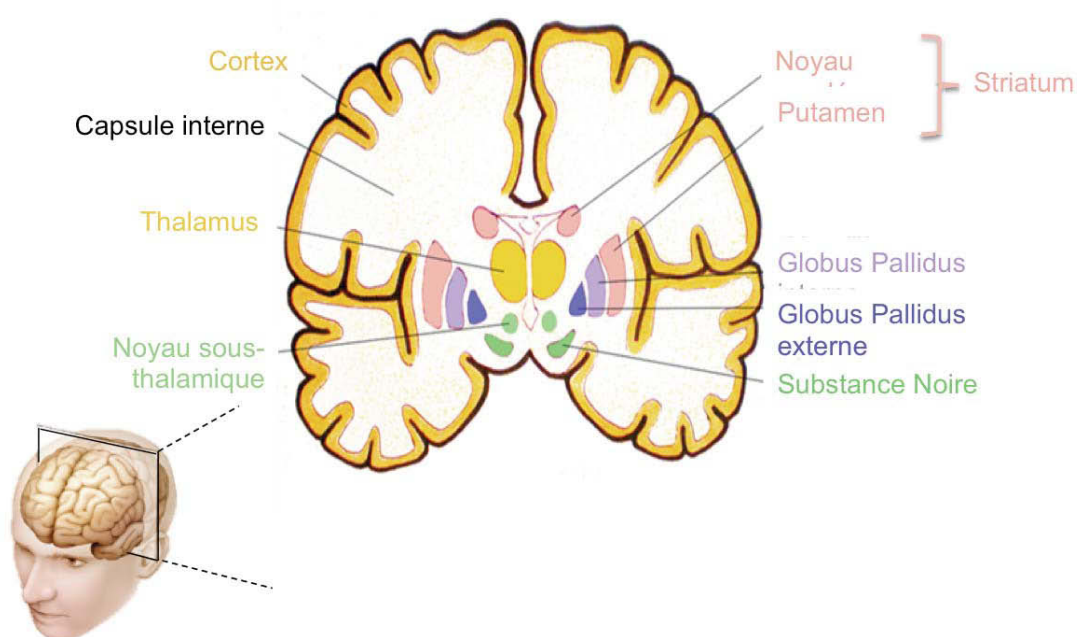


Figure 4. Anatomie des ganglions de la base. Coupe coronale

D'autres structures comme le noyau pédonculopontin (PPN) et le complexe central du thalamus (centre médian et noyau parafasciculaire CM-Pf) sont désormais également assimilés au système des ganglions de la base (Yelnik 2002).

b) Organisation fonctionnelle

A la fin des années 1980, un modèle d'organisation des noyaux gris centraux a été proposé pour expliquer les signes cliniques de la maladie de Parkinson, suite à une meilleure compréhension de l'anatomie, de la physiologie et de la pharmacologie des différentes structures impliquées dans le contrôle du mouvement (DeLong 1990). Les noyaux gris centraux sont interconnectés pour former des boucles de rétrocontrôle modulant l'activité du cortex cérébral (boucle cortico-striato-pallido-sous-thalamo-corticale). Les circuits moteurs intervenant dans le contrôle du mouvement et impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson sont représentés dans la Figure 5.

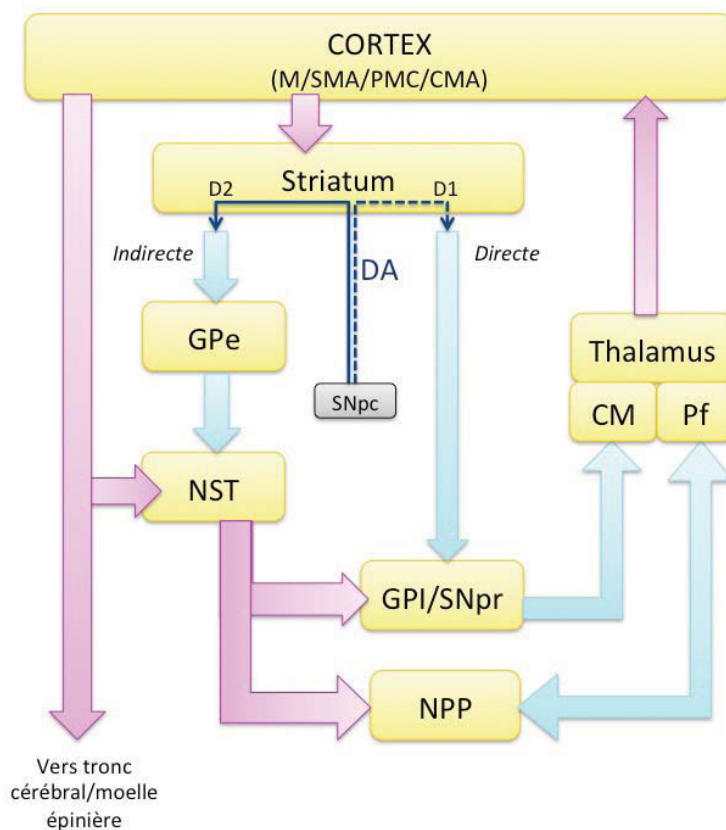


Figure 5. Schéma du modèle classique d'organisation fonctionnelle des noyaux gris centraux (schéma modifié d'après Alexander and Crutcher, 1990) Les flèches bleues indiquent les projections inhibitrices et les roses, les projections excitatrices. Noter que le striatum communique avec les neurones du globus pallidum interne (GPI) et de la substance noire pars reticulata (SNpr) à travers une voie directe, et avec des connexions synaptiques dans le globus pallidum externe (GPe) et le noyau sous thalamique (NST) à travers une voie indirecte. La dopamine (DA) inhibe l'activité neuronale de la voie indirecte et joue un rôle excitateur sur les neurones striataux de la voie directe. SMA : aire motrice supplémentaire, PM : pré-moteur, M : moteur.

Le cortex sensitivo-moteur et pré-moteur envoie des afférences glutamatergiques excitatrices à partir de neurones appartenant aux couches supra et infra-granulaires sur différentes parties du striatum et en particulier le Pu, en ce qui concerne les circuits impliqués dans le contrôle du

mouvement. Les voies cortico-striatales représentent la « porte d'entrée » des noyaux gris centraux. Les neurones striataux qui sont connectés avec les afférences glutamatergiques corticales sont majoritairement des « neurones moyens à épines » (>90 %) et utilisent comme neurotransmetteur principal le GABA (acide γ -aminobutyrique) (Kawaguchi et al. 1995).

A partir du striatum, deux circuits séparés vont moduler de façon opposée l'activité neuronale des noyaux thalamiques qui envoient des afférences excitatrices sur le cortex cérébral :

- **la voie directe.** Elle comprend des neurones striataux GABAergiques, utilisant également comme neurotransmetteurs la substance P ainsi que la dynorphine. Ces neurones envoient des afférences inhibitrices aux neurones GABAergiques du GPi et de la SNpr. L'activation de cette voie tend à désinhiber le thalamus.
- **la voie indirecte.** Elle est constituée de neurones striataux contenant à la fois du GABA et de l'enképhaline qui projettent des efférences GABAergiques inhibitrices sur le GPe. Ce dernier envoie des efférences GABAergiques inhibitrices au NST qui lui-même envoie des projections glutamatergiques excitatrices sur les neurones du GPi et de la SNpr. L'activation de la voie indirecte tend à diminuer l'activité des neurones du GPe et ainsi par le jeu d'une double inhibition, de désinhiber le NST. L'augmentation de la voie excitatrice provenant du NST renforce l'inhibition des neurones du GPi et de la SNpr et augmente l'inhibition des neurones des noyaux thalamiques. Les deux voies directe et indirecte de projection du striatum ont ainsi des effets opposés sur les noyaux de « sortie » des ganglions de la base (GPi et de la SNpr).

Une organisation interne des neurones striataux est révélée après un marquage à l'acétylcholinestérase (AChE). Il existe une région du striatum riche en AChE appelée matrice extrastriosomale au sein de laquelle apparaissent des zones pauvres en AChE appelées striosomes (Graybiel et al. 2000). Les neurones constituant la matrice reçoivent des afférences glutamatergiques corticales et les voies de projections directe et indirecte sur les noyaux de sortie des ganglions de la base sont originaires de ce compartiment du striatum. Les cellules constituant les striosomes reçoivent des afférences du cortex limbique et préfrontal et projettent sur la SNpc. Les études de Graybiel et ses collaborateurs (Graybiel et al. 2000) mettent en évidence la possibilité que la régulation du mouvement par les ganglions de la base dépend non seulement de l'équilibre d'activité entre les voies directe et indirecte issues de la matrice striatale, mais aussi d'un équilibre entre l'activité de ces voies et celle de la voie striosomale.

Les voies dopaminergiques provenant de la SNpc modulent de façon opposée l'activité des voies efférentes striatales directes et indirectes selon le type de récepteur à la dopamine qu'elles expriment. Yung et al ont montré chez le rat que l'expression des récepteurs dopaminergiques étaient différente selon la population de neurones striataux (Yung et al. 1995). Les neurones appartenant à la **voie directe** expriment de façon préférentielle les **récepteurs D₁** alors que les neurones striataux qui appartiennent à la **voie indirecte** expriment les récepteurs **D₂**. L'étude de Aubert et al montre que cette ségrégation des récepteurs dopaminergiques décrite chez les rongeurs existe également chez le primate (Aubert et al. 2000). La dopamine exerce une action excitatrice par l'intermédiaire des récepteurs dopaminergiques D₁, et à l'opposée, une action inhibitrice par l'intermédiaire des récepteurs D₂. La dopamine intervient ainsi en facilitant la conduction à travers la voie directe qui exerce un effet excitateur sur le thalamus et en inhibant la conduction à travers la voie indirecte qui inhibe le thalamus. Elle intervient donc en facilitant le mouvement.

Ce schéma du fonctionnement des ganglions de la base a le mérite de la simplicité, mais il est devenu obsolète. On a décrit de nombreuses autres connections. Par exemple, le thalamus est directement connecté avec chaque structure des ganglions de la base. Il en est de même du NST, celui-ci joue un rôle clé dans le fonctionnement des noyaux gris centraux car il reçoit une projection majeure du cortex et peut ainsi être considéré comme une autre structure d'entrée du circuit au même titre que le striatum. De plus, outre les projections bien connues de sortie du NST (par exemple, GPe, GPi/ SNr, et noyaux PPN), il existe des projections directes du NST sur le thalamus ventral. Des connexions réciproques entre le GPe et le striatum et entre le striatum et les neurones dopaminergiques de la SNc ont également été reconnues. De plus, l'ensemble NST-GPe-GPi forme un microcircuit où le GPe apparaît stratégiquement placé pour contrôler l'activité de sortie des GB. Enfin, en plus de l'entrée corticale, les GB reçoivent des afférences de plusieurs noyaux sous-corticaux (noyaux caudal intralaminaires, PPN, noyaux du colliculus supérieur, le locus coeruleus et le noyau du raphé) et, plus récemment mis en évidence, du thalamus (Obeso and Lanciego 2011) (Figure 6).

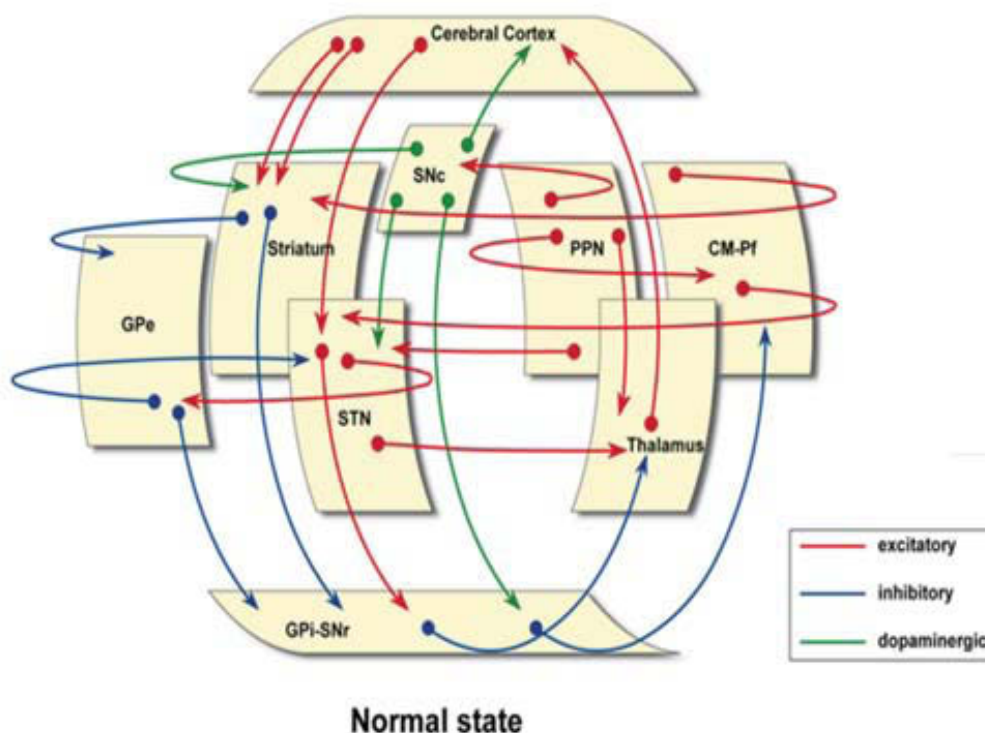


Figure 6. Le modèle classique « boîtes et flèches » des GB mis à jour (d'après Obeso et Lanciego 2011). CM-Pf : complexe central du thalamus (centre médian et noyau parafasciculaire) ; GPe : globus pallidus externe ; GPI : globus pallidus interne ; NST : noyau subthalamique ; PPN : noyau pédonculo-pontin ; SNc : substance noire pars compacta ; SNr : substance noire pars reticulata. Il est important de souligner que ces schémas présentent un certain nombre de boucles modulatrices transversales, qui ont souvent été négligées dans le modèle classique des GB.

2. Système dopaminergique

a) La dopamine

(1) Histoire de sa découverte

La découverte de la dopamine comme neurotransmetteur dans le cerveau est l'un des événements importants dans le développement des neurosciences modernes. Tout d'abord identifiée comme un simple intermédiaire de la synthèse d'adrénaline et de noradrénaline à partir du tryptophane, c'est dans le milieu des années 1950 que la dopamine est reconnue comme une molécule d'importance au sein du système nerveux central (SNC). En 1958, l'équipe suédoise de Carlsson montre qu'au niveau du striatum, la dopamine est présente en grande quantité par rapport à la noradrénaline (Carlsson and Waldeck 1958). Par la suite, l'avènement de nouvelles techniques telles que l'immunohistochimie par fluorescence et plus tard de la microdialyse chez le rat ont permis de mettre en évidence les différentes voies neuronales dopaminergiques projetant depuis la SNpc jusqu'au striatum, l'aire tegmentale ventrale et les aires limbiques du cerveau (Andén et al. 1965;

Andén et al. 1966). Depuis ces premiers travaux, la dopamine s'est révélée être une molécule clef au sein du SNC. En effet, la dopamine possède un rôle majeur dans les fonctions cognitives, affectives et motrices et la perturbation du système dopaminergique est proposée pour être à la base de plusieurs troubles neurologiques et psychiatriques majeurs comme les addictions, la schizophrénie, la maladie de Parkinson ou encore les troubles de l'attention (Björklund and Dunnett 2007; Grace et al. 2007).

(2) Synthèse et dégradation.

La synthèse de la dopamine est réalisée majoritairement au sein des terminaisons nerveuses. Elle est produite en 2 étapes à partir de son précurseur : la L-tyrosine (Figure 7).

- Tout d'abord la **L-tyrosine** est transformée en **L-dopa** par la **tyrosine hydroxylase** (TH). La TH est l'enzyme limitante de la synthèse de la dopamine. En effet, malgré un accroissement de la disponibilité en L-tyrosine, la TH n'arrive pas à produire plus de L-dopa. A l'inverse, une inhibition de la TH induit une diminution de synthèse de L-dopa.
- Puis, la **L-dopa** est convertie en **dopamine** par une réaction de décarboxylation réalisée par la **dopa-décarboxylase**.

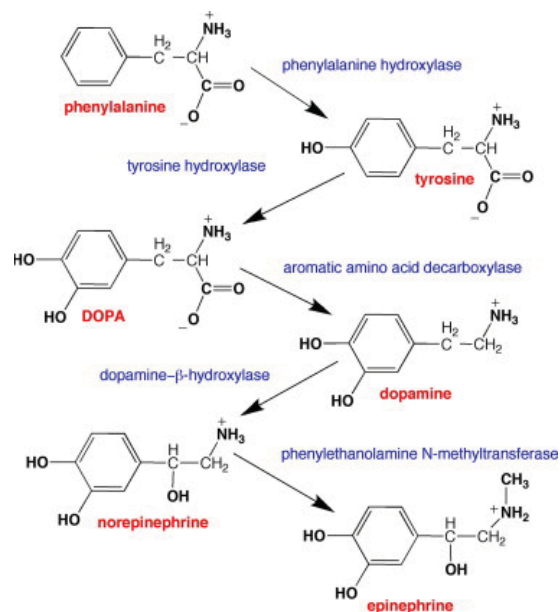


Figure 7. Synthèse de la dopamine. D'après (Daubner et al. 2011)

Enfin, la dopamine synthétisée est stockée dans des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons neuronales. Les vésicules seront libérées dans l'espace synaptique lors de l'arrivée du potentiel d'action. Cette libération est calcium-dépendante. Néanmoins, on peut noter qu'il existe une libération vésiculaire de la dopamine. Celle-ci passe par un transporteur membranaire : le **DAT** pour dopamine transporteur (pour revue: Leviel 2011).

La dégradation de la dopamine s'opère soit à l'intérieur du neurone par des enzymes mitochondriales, les MAO, soit dans la fente synaptique par une enzyme extracellulaire, la catécholamine-Ométhyltransférase (COMT) (Figure 8). Les MAO existent sous deux isoformes dans le cerveau : les isoformes A et B. La MAO-A est localisée sur les mitochondries des cellules gliales, elle est responsable de la dégradation de la dopamine accumulée dans la fente synaptique. La MAO-B est localisée sur les mitochondries de la terminaison pré-synaptique et se charge de la dégradation de la dopamine intracellulaire. La dopamine est alors catabolisée en DOPAC.

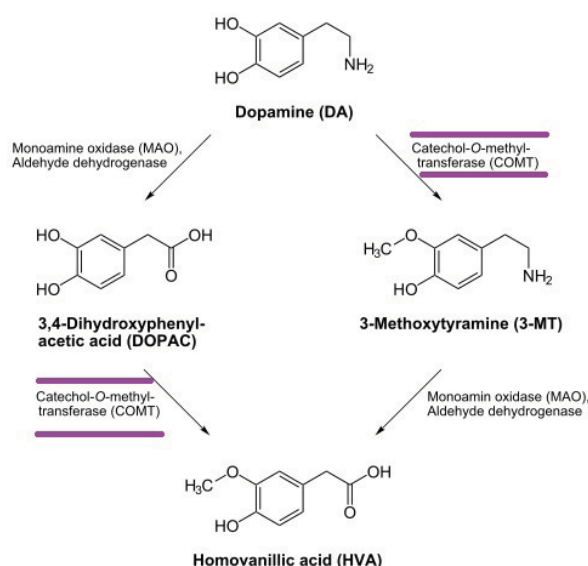


Figure 8. Catabolisme de la dopamine.

b) Les voies dopaminergiques

Dans le cerveau, les neurones dopaminergiques sont organisés en plusieurs circuits neuronaux. On distingue trois composantes majeures : la voie nigrostriée, la voie méso-limbique et la voie méso-corticale (Figure 9). Chacune de ces voies va révéler des rôles particuliers de la dopamine dans la maladie de Parkinson.

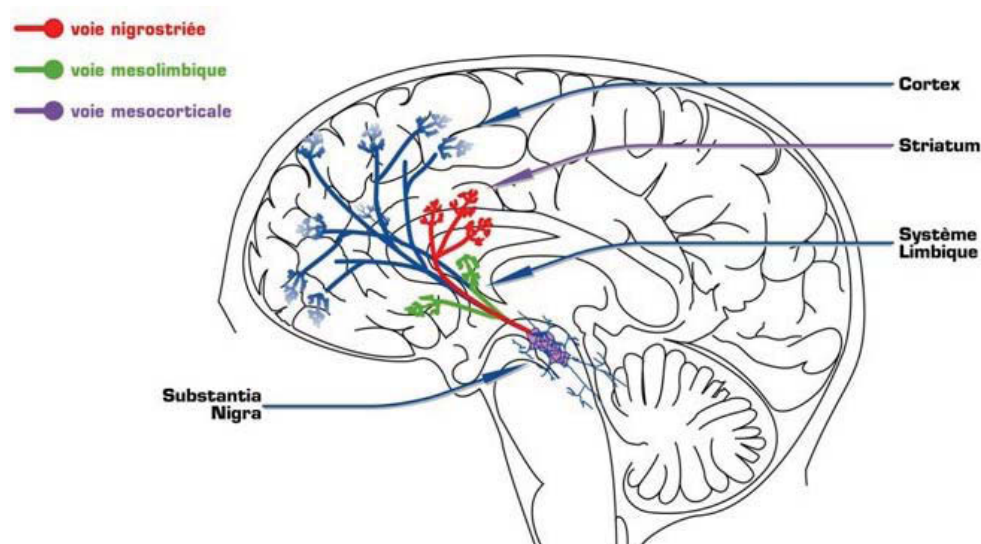


Figure 9. Les principales voies dopaminergiques.

Dans le système nerveux central, la majeure partie des corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont localisés au sein de la substance noire pars compacta (A9), de l'aire tegmentale ventrale (A10) et de l'aire rétrobulbaire (A8).

Les voies méso-limbique et méso-corticale ont pour origine l'aire tegmentale ventrale. La **voie méso-limbique** va se projeter essentiellement vers le NC (partie ventrale du striatum), le septum, l'amygdale et l'hippocampe. Elle est impliquée dans les mécanismes de la mémoire, des émotions et du comportement. La **voie méso-corticale**, quant à elle, va se diriger vers le cortex préfrontal et limbique. Siège du circuit de la récompense, son atteinte dans la maladie de Parkinson joue un rôle prédominant dans le développement des conduites addictogènes.

La **voie nigrostriée**, prend naissance dans la substance noire pars compacta et se projette vers le striatum dorsal. Elle est la voie la plus touchée par le processus dégénératif de la maladie de Parkinson. Son rôle central dans le contrôle des fonctions motrices va conduire à l'apparition des troubles moteurs caractéristiques de la maladie suite à son atteinte.

Nous mentionnerons également ici la présence d'une autre voie dopaminergique : la **voie tubéro-infundibulaire** ayant pour origine l'hypothalamus et projetant vers l'hypophyse. Impliquée dans la sécrétion de certaines neuro-hormones comme la prolactine, cette voie reste peu impliquée dans la maladie de Parkinson.

3. Organisation fonctionnelle des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson

L'organisation des voies des GB, suite à la dénervation dopaminergique nigro-striatale est résumée sur la Figure 10.

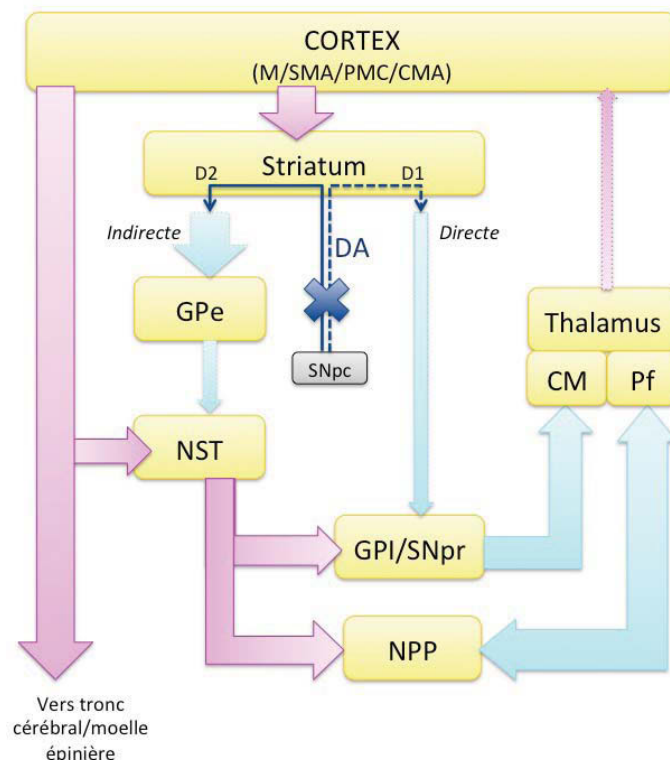


Figure 10. Organisation fonctionnelle des NGC après dégénérescence nigro-striatale (d'après Obeso et al, 2000). La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc entraîne une hypoactivité de la voie directe (flèche bleu foncée continue du striatum au complexe GPI / SNpr) et une hyperactivité de la voie indirecte (flèche large du striatum au GPe) à l'origine d'une hyperactivité de la voie allant du NST au GPI / SNpr. Il en résulte une hyperactivité des neurones appartenant au GPI / SNpr et une diminution de l'activité excitatrice thalamo-corticale. Les flèches bleues indiquent les projections inhibitrices et les roses, les projections excitatrices. L'épaisseur de flèches reflète les changements d'activité des neurones dans la maladie de Parkinson : une flèche plus fine correspond à une diminution de l'activité de la voie impliquée. A l'inverse, un épaississement de la flèche reflète une augmentation.

La perte de l'innervation dopaminergique striatale entraîne une augmentation de l'activité des voies de sortie des NGC, le GPi et la SNpr. L'augmentation de l'activité tonique de ces structures renforce l'inhibition des neurones thalamiques projetant sur le cortex sensitivo-moteur, à l'origine d'une hypoactivité corticale. L'hyperactivité des noyaux de sortie des ganglions de la base serait liée d'une part à la diminution de l'activité GABAergique inhibitrice provenant des neurones striataux à l'origine de la voie directe et d'autre part à l'augmentation de l'activité excitatrice glutamatergique provenant du NST. En effet, suite à la dénervation dopaminergique, la voie GABAergique inhibitrice provenant

des neurones striataux à l'origine de la voie indirecte devient hyperactive, entraînant une diminution de l'activité des neurones GABAergiques du GPe, le NST est ainsi libéré du contrôle inhibiteur tonique normalement exercé par les neurones GABAergiques du GPe.

D'après ce schéma, le striatum est vu comme la principale structure d'entrée des ganglions de la base. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous focaliserons sur ce noyau.

a) Le striatum : structure d'entrée des ganglions de la base

(1) La voie cortico-striatale glutamatergique

La voie corticostriatale glutamatergique est l'afférence glutamatergique majeure au niveau du striatum. Plusieurs résultats expérimentaux ont montré l'existence d'une augmentation de la transmission glutamatergique cortico-striatale dans les modèles expérimentaux de MPI.

L'analyse des caractéristiques morphologiques des synapses glutamatergiques à contact asymétrique formées entre les afférences cortico-striatales et les dendrites des neurones moyens « à épines » dans le noyau caudé de patients parkinsoniens et de sujets contrôles a révélé que la perte de la dopamine est associée à une augmentation significative du diamètre de l'aire post-synaptique (+ 24 %) et du nombre de synapses perforées (+ 88 %) (Anglade et al. 1996). De même, on retrouve cette observation dans les travaux réalisés chez le rat lésé par une administration de 6-OHDA (Ingham et al. 1998; Meshul et al. 1999; Meshul et al. 2000). De plus, récemment, l'analyse quantitative des aires post-synaptiques glutamatergiques grâce à la modélisation en 3D a montré que la taille de ces aires post-synaptiques est augmentée chez le primate non-humain modèle de la maladie de Parkinson suggérant ainsi une plasticité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques (Villalba and Smith 2011). Ensemble, ces résultats suggèrent une **hyperactivité au niveau des ces synapses glutamatergiques après une déplétion en dopamine.**

Cette hyperactivité de la voie cortico-striatale, décrite après dénervation nigro-striatale, est aussi en accord avec des mesures réalisées *in vivo* en microdialyse qui décrivent une **augmentation des taux extracellulaires de glutamate dans le striatum** de rats parkinsoniens (Lindefors and Ungerstedt 1990; Meshul et al. 1999; Jonkers et al. 2002) .

De plus, en association avec cette hyperactivité cortico-striatale, des observations en microscopie électronique ont montré une modification des associations entre les éléments axio-spino-synaptiques glutamatergiques en provenance du cortex et les astrocytes du striatum chez des animaux traités au MPTP comparé aux animaux contrôle (Villalba and Smith 2011). Notamment, il a été constaté une **modification des digitations astrocytaires** allant vers une augmentation du périmètre de couverture des terminaisons axio-spino-synaptiques chez les animaux MPTP (Figure 11). Cette modification est encore plus visible après modélisation en 3D de ces terminaisons (Figure 12).

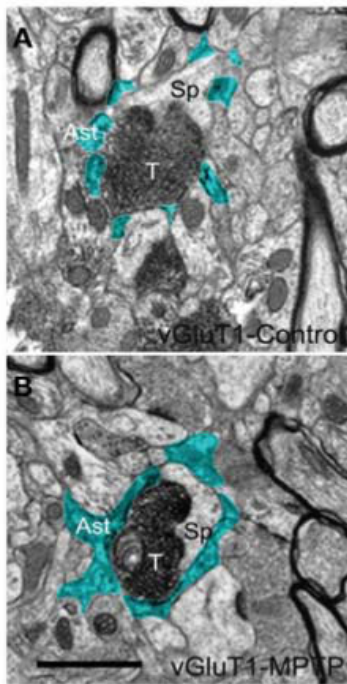


Figure 11. Microscopie Electronique d'une synapse tripartite au niveau du striatum. Le marquage vGluT1 permet l'identification de la terminaison glutamatergique comme provenant de la voie cortico-striatale. On constate un changement de morphologie des digitations astrocytaires chez les animaux traités au MPTP (B) par rapport aux individus contrôle (A). Abréviations : astrocyte (Ast), terminaison nerveuse (T), apine dendritique (Sp). (Villalba and Smith 2011)

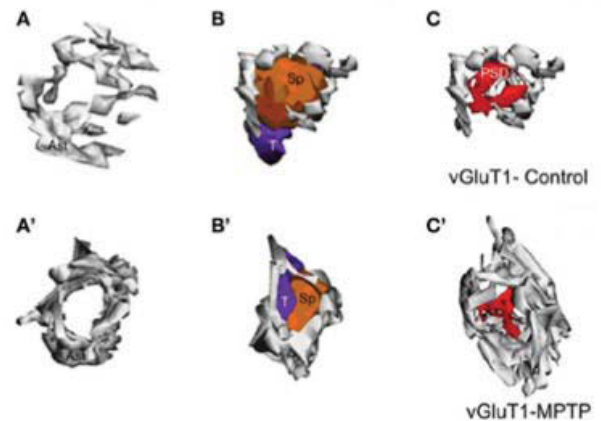


Figure 12 Reconstruction 3D d'une synapse tripartite au niveau du striatum chez un animal contrôle (A,B,C) et chez un primate non-humain traité au MPTP (A',B',C'). (Villalba and Smith 2011)

Ensemble, ces résultats montrent que :

- **la lésion des voies dopaminergiques nigro-striatales entraîne une augmentation de la transmission glutamatergique cortico-striatale ;**
- **cette modification de la transmission glutamatergique est associée à des changements du micro-environnement astrocytaire au niveau du striatum.**

Les changements induits par la dénervation dopaminergique et décrits ici pourraient avoir des conséquences sur la biochimie du striatum.

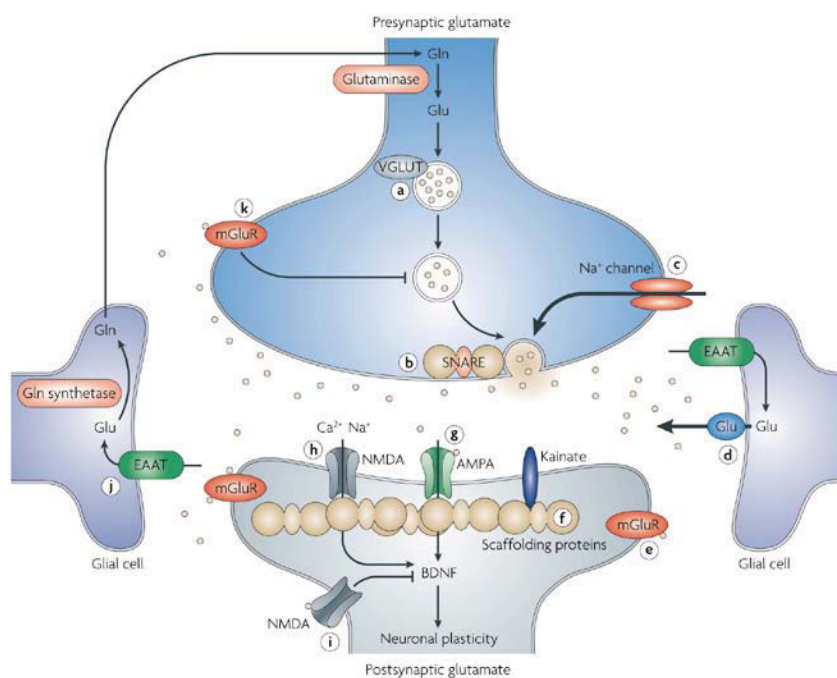
(2) Cycle glutamate-glutamine

(a) Découverte de l'existence du cycle glutamate-glutamine

Si la métabolisation du glutamate en glutamine est connue de puis longtemps, notamment grâce à l'utilisation de radio-traceurs marqués au carbone ^{14}C , le concept prédominant distinguait deux pools de glutamate. Le premier, ce présentant sous forme de vésicules contenant le glutamate « non-métabolique » utilisé pour la neurotransmission et n'interagissant pas avec le second pool de glutamate issu du métabolisme. Ce concept fût remis en questions grâce aux premiers travaux de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur le cerveau humain ayant montré une synthèse de glutamine suite à l'injection de glucose marqué au ^{13}C (Gruetter et al. 1994). Cette observation fût la première à identifier un transfert rapide du marquage ^{13}C du glutamate (majoritairement neuronal) vers la glutamine (majoritairement astrogliale) suggérant ainsi l'existence d'un mécanisme de métabolisation du glutamate impliquant une interaction neurone-glie. Plus tard, l'émergence du concept de cycle glutamate-glutamine fût confirmée par de nouveaux travaux de spectroscopie RMN (SRM). En effet, une synthèse rapide et significative de glutamine a été montrée dans des études utilisant des infusions de glucose marqué au ^{13}C (marqueur préférentiel du glutamate neuronal en raison de la demande énergétique élevée de ces cellules) (Taylor et al. 1996). De même, les travaux ayant utilisé une infusion d'acétate marqué au ^{13}C , marqueur spécifique des cellules gliales, ont montré une synthèse de glutamine préalable à la détection du glutamate (Lebon et al. 2002; Deelchand et al. 2009). Ensemble, ces études de SRM ont mis en évidence le transfert du marquage au ^{13}C des neurones vers les astrocytes et des astrocytes vers les neurones mettant ainsi à jour la présence d'un cycle métabolique entre glutamate et glutamine impliquant une interaction entre neurones et astrocytes.

(b) Métabolisme du cycle glutamate-glutamine

Lors de la neurotransmission, en réponse à la dépolarisation présynaptique, les vésicules contenant le glutamate libèrent leur contenu dans la synapse par un phénomène d'exocytose causant une augmentation de 1000 fois de la concentration extracellulaire en glutamate. Le glutamate ainsi libéré va alors se fixer sur ses récepteurs post-synaptiques (récepteurs ionotropiques : NMDA, AMPA ; récepteurs kainates et récepteurs métabotropiques), stimulant ainsi la dépolarisation de la cellule post synaptique via un influx de cations (Figure 13). Le glutamate libéré est ensuite rapidement capté par les astrocytes, grâce à un système de transporteurs Na^+ dépendant (Anderson and Swanson 2000), afin de recycler et de régénérer les pools de glutamate. Une fois dans les astrocytes, le glutamate est converti en glutamine grâce à l'action de la **glutamine synthase** (GS). La glutamine est alors libérée à son tour dans l'espace extracellulaire via un système de diffusion facilitée (Na^+ et H^+ dépendant) et des transporteurs du système N (Chaudhry et al. 2002). Celle-ci entre ensuite dans les neurones grâce aux transporteurs du système A où elle est transformée en glutamate grâce à l'action de la **glutaminase** (Figure 14). Ainsi le cycle glutamate-glutamine permet de reformer les pools vésiculaires de glutamate.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 13. Représentation d'une synapse glutamatergique (Sanacora et al. 2008).

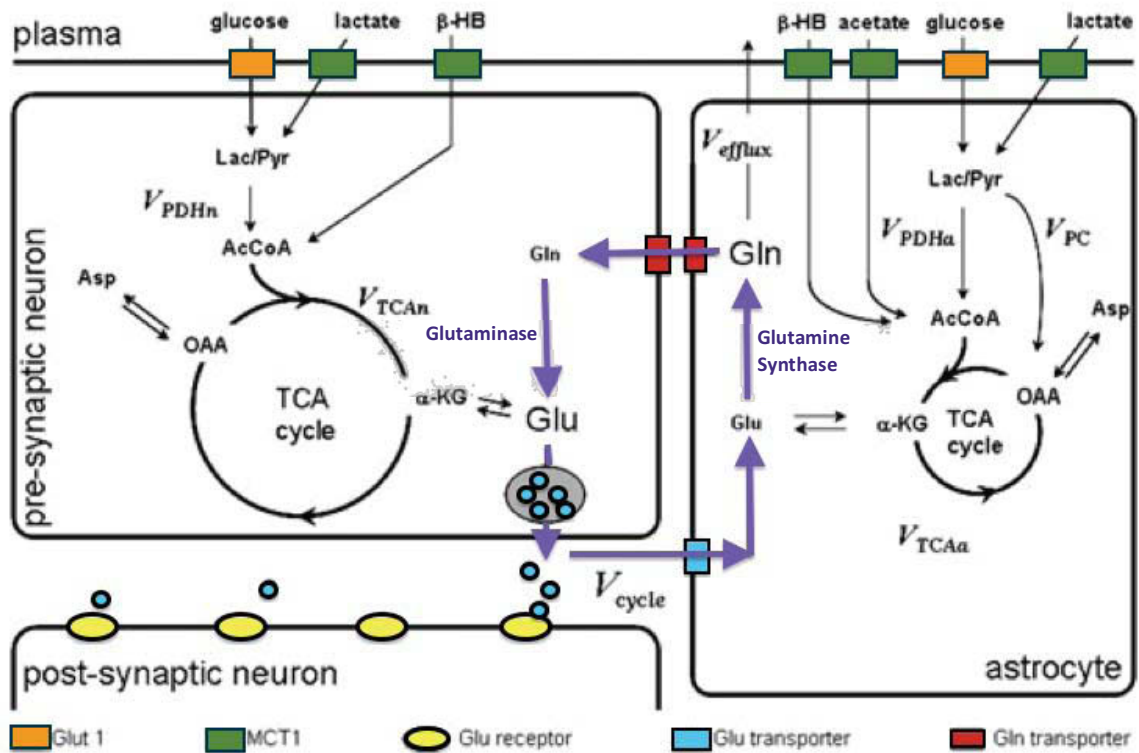


Figure 14. Le cycle glutamate-glutamine. (Rothman et al. 2011)

Un dysfonctionnement de cet équilibre, recyclage et métabolisation du glutamate, pourrait être à l'origine de l'évolution d'un certain nombre de maladies neurodégénératives, dont la maladie de Parkinson.

(3) Le cycle glutamate-glutamine dans les pathologies neurodégénératives.

Des modifications du cycle glutamate-glutamine seraient impliquées dans les neuropathologies dégénératives.

On retrouve notamment une baisse de concentration en glutamate dans la maladie d'Alzheimer (Maltezos et al. 2014). Cette baisse observée par SRM du ^1H dans le NC et le Pu de patients laisse entrevoir une modification de la transmission glutamatergique dans cette zone impliquée notamment dans le processus de l'attention.

Dans la maladie de Parkinson, (comme vu précédemment) la lésion de la voie dopaminergique nigro-striatale entraîne une augmentation de la transmission glutamatergique cortico-striatale, associée à

des changements du micro-environnement astrocytaire au niveau du striatum. De plus, les travaux de SRM du ^1H réalisés dans le striatum d'animaux modèles de la maladie de Parkinson ont montré une augmentation significative des taux de glutamate, glutamine et GABA dans le striatum suite à la dénervation dopaminergique (Chassain et al. 2008; Bagga et al. 2013; Chassain et al. 2013). Ensemble, ces résultats suggèrent une implication du cycle glutamate-glutamine dans la pathologie parkinsonienne. Ce sera l'objet de notre étude.

C. Traitements de la maladie de Parkinson

Le traitement de la maladie de Parkinson émerge avec deux grands noms de la neurologie de la fin du XIX^{ème} siècle : Jean-Martin Charcot et William Gowers. Si les premiers traitements mis au point avaient recours à l'utilisation de drogues anti-cholinergiques dérivées de plantes (hyoxamine, belladone), le manque d'efficacité de ces dernières poussa Jean-Marie Charcot à abandonner la pharmacologie et se diriger vers l'utilisation d'une thérapie anecdotique : la thérapie par vibration (Figure 15).



Figure 15. Le "fauteuil trépidant" de Jean Martin Charcot pour le traitement de la maladie de Parkinson. (extrait de Goetz 2011).

Le traitement de maladie de parkinson ne pris son envol qu'avec la découverte de la synthèse de la dopamine au début du XX^{ème} siècle.

1. Les traitements pharmacologiques

a) L-dopa

La **L-dopa** (lévo-dopa) constitue la pierre angulaire dans le traitement de la maladie de Parkinson. Synthétisée pour la première fois en 1913 par Markus Guggenheim, elle fût testée pour la première fois chez des patients présentant un parkinsonisme sévère en 1961 par Birkmayer et Hornykiewicz avant d'être totalement admise comme la molécule la plus efficace pour traiter les troubles parkinsoniens en 1967 (Cotzias et al. 1967).



Figure 16. Markus Guggenheim (à gauche) en 1911 dans son laboratoire Roche Grenzäch.

Précurseur de la dopamine, la L-dopa va permettre une augmentation de cette dernière au niveau des récepteurs dopaminergiques centraux induisant de ce fait une amélioration des signes cliniques de la maladie. Encore largement utilisée aujourd'hui sous différentes formes galéniques (standard ou libération prolongée ou dispersible), on la retrouve associée à des inhibiteurs de la MonoAmine Oxidase B ou MAO-B (benzérazide ou carbidopa) ou de la catechol-O-methyl transferase ou COMT (entacapone) afin de limiter sa dégradation et ainsi d'améliorer sa biodisponibilité (Figure 17).



Figure 17. Illustration de l'action de L-dopa dans le traitement de la maladie de Parkinson.

Cependant, malgré son efficacité aux stades précoces de la maladie, le traitement à la L-dopa entraîne des complications induites telles que des dyskinésies et des fluctuations motrices. Ces complications sont associées à la pharmacocinétique de la molécule (Guridi et al. Obeso 2012).

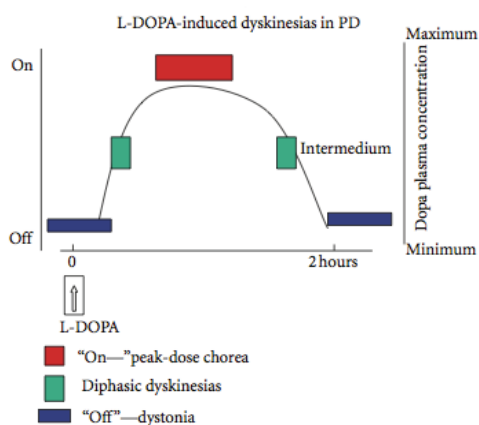


Figure 18. Relation entre le développement des dyskinésies dopa-induites et la concentration de L-dopa plasmatique. Le pic de L-dopa est associé à la période « ON » des dyskinésies en parallèle du meilleur effet sur les symptômes cliniques de la maladie. Des dyskinésies diphasiques peuvent apparaître en phase intermédiaire lors de l'augmentation et de la diminution de la concentration en L-dopa. La période « OFF » ou période de dystonie est caractérisée par l'apparition de postures douloureuses (Guridi et al. 2012).

Ainsi de nouvelles formulations de la L-dopa sont en cours de développement afin d'obtenir une libération en continue de la L-dopa. C'est le cas du gel intestinal **DUODOPA®** (Figure 19).

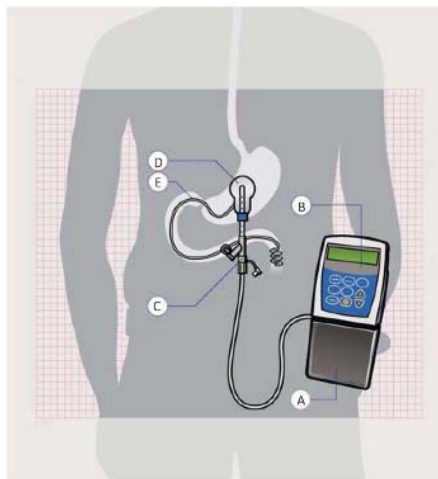


Figure 19. Kit Duodopa®. A) Réservoir contenant le traitement, B) Pompe, C) Connecteur, D) Sonde gastrique, E) Cathéter placé dans le duodénum, lieu de libération du traitement. D'après Karlsborg et al. 2010.

b) Agonistes dopaminergiques

Les complications motrices de la dopa thérapie ont conduit à rechercher d'autres voies thérapeutiques susceptibles d'améliorer la transmission dopaminergique.

Premier agoniste dopaminergique identifié, l'**apomorphine**, est utilisé dans le traitement des troubles parkinsoniens dopa-induit. D'une efficacité comparable à la L-dopa mais disposant d'une demi-vie limitée (40min), elle est utilisée pour compenser rapidement les troubles induits en période « OFF » chez les patients grâce à une injection en sous-cutanée.

Plus tard, l'évolution des connaissances sur les récepteurs dopaminergiques présents au niveau du striatum a permis le développement de nouveaux agents pharmaceutiques stimulant ces récepteurs au niveau post-synaptique (Figure 20). La majorité de ces molécules ciblent les récepteurs D₁ et/ou D₂ ou bien les récepteurs D₂ et D₃. Ces composés sont dérivés de l'ergot de seigle (**bromocriptine, lisuride, pergolide et cabergolide**) ou sont des produits de synthèse (**ropirinole, pramipexole, piribédil et rotigotine**) (pour revue Brooks 2000). Même s'ils demeurent moins efficaces que la L-dopa, des études ont montré leur utilité dans la réduction de l'incidence des complications motrices

en monothérapie initiale (Rascol et al. 2000) et en phase avancée de la maladie en association à la L-dopa.

c) Inhibiteurs enzymatiques (IMAO-B et ICOMT)

Les inhibiteurs enzymatiques de la dégradation de la L-dopa vont augmenter la biodisponibilité de la dopamine au niveau post-synaptique. Ces inhibiteurs sont les ICOMT (inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl-transférase) et les IMAO-B (inhibiteurs de la monoamine oxydase) (Figure 20).

L'**entacapone** et la **tolcapone** sont des inhibiteurs de la **COMT**. Agissant au niveau périphérique, ces molécules empêchent la métabolisation de la L-dopa en 3-O-méthyl-dopa (composé inactif). Bien que la tolcapone soit plus efficace que l'entacapone, elle reste prescrite suite aux échecs de traitement par l'entacapone et sous contrôle médical strict en raison des troubles hépatiques qu'elle peut induire.

La **sélégiline** et la **rasagiline** constituent des inhibiteurs de la **MAO-B**. Si la sélégiline a montré son efficacité dans le traitement de la maladie de Parkinson, en monothérapie aussi bien qu'associé à la L-dopa dans l'étude DATATOP (Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism) (Shults 1993), sa métabolisation conduit à la production de L-amphétamine qui peut être mal toléré par le patient. Ainsi la rasagiline a récemment été proposée comme alternative. Notamment, l'étude ADAGIO (Attenuation of Disease Progression with Azilect Given Once-daily) a montré le bénéfice d'un traitement à la rasagiline (Azilect®) dans le ralentissement de l'évolution de la maladie, soulignant ainsi un effet neuroprotecteur (Olanow et al. 2009).

d) Autres molécules

Premier traitement historique jusqu'à l'avènement de la L-dopa, les **anticholinergiques** sont également utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson. Particulièrement efficaces pour faire cesser les tremblements, ils sont cependant peu prescrits car ils présentent de nombreux effets secondaires (accélération du rythme cardiaque, troubles psychiques, hallucinations etc) (Figure 20).

L'**amantadine** (Mantadix®), molécule antivirale, antagoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA a été découvert fortuitement au cours d'un essai clinique. Son effet antiparkinsonien est modéré et s'exerce principalement sur l'akinésie et l'hypertonie (Figure 20).

La L-dopa reste le traitement privilégié de la maladie de Parkinson. Son association avec des inhibiteurs de sa dégradation permet d'augmenter son efficacité au niveau central. Afin de prévenir et/ou de réduire les fluctuations motrices dopa-induite, l'utilisation d'agonistes dopaminergiques ainsi que de nouvelles formulations pour une libération progressive de la L-dopa peuvent être utilisées (Figure 20).

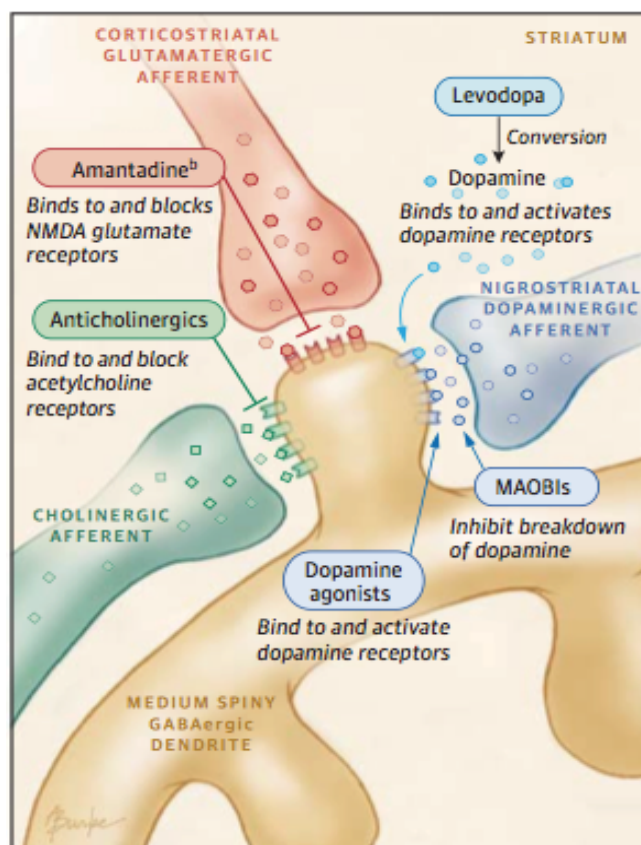


Figure 20. Schéma récapitulatif des principaux traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson.

2. Les traitements chirurgicaux

Dès le début du XX^{ème} siècle, avant l'avènement des traitements anti-parkinsoniens modernes, la chirurgie était couramment utilisée pour le traitement des troubles moteurs notamment dans la maladie de Parkinson. Grâce à l'introduction de la chirurgie stéréotaxique en 1947, la **neurochirurgie** est devenue plus précise et plus fiable (Spiegel et al. 1947). C'est en 1953, lors d'une opération, que le neurochirurgien I.Cooper blessa accidentellement l'artère choroïdale antérieure d'un patient Parkinsonien, et fût forcé de la ligaturer. A sa grande surprise cette ligature entraîna une réelle diminution des tremblements et de la rigidité de ce patient (Cooper 1953). Sur la base de cette observation, de nombreux travaux furent menés dans le but de cibler des structures cérébrales profondes et de les détruire afin d'améliorer les symptômes de la maladie. Notamment, des procédures de **coagulation électriques** de noyaux tels que le globus pallidus, le thalamus et le noyau lenticulaire sont réalisées grâce aux premières chirurgies stéréotaxiques. C'est ainsi qu'en 1960, une équipe scandinave publia la première étude menée sur une cohorte de 80 patients Parkinsoniens ayant subi une pallidectomie (Svennilson et al. 1960). Cependant, l'avènement du traitement à la L-Dopa dans les années 60-70 mit fin aux travaux initiés pour le traitement chirurgical de la maladie. Mais cet arrêt ne fût que provisoire. En effet, si la L-Dopa se trouve être une stratégie thérapeutique efficace, les effets secondaires induits par ce traitement ne tardent pas à se manifester comme l'apparition de complications motrices dopa-induites tels que les dyskinésies. Face à ces nouveaux troubles, et en parallèle de l'évolution de la neurochirurgie, de nouvelles stratégies thérapeutiques chirurgicales vont alors être appliquées à la maladie de Parkinson. Notamment, le développement de la **stimulation cérébrale profonde** va marquer un tournant dans l'approche chirurgicale de traitement de la maladie de Parkinson (Benabid et al. 1987, Benabid et al. 1994).

a) La chirurgie lésionnelle

Introduite en 1952 par le Dr Leksell puis oubliée face à l'avènement de la L-Dopa, la **pallidectomie** a été réintroduite au début des années 1990 grâce à l'évolution de la stéréotaxie moderne. Utilisée dans le but de réduire les fluctuations motrices, les tremblements et les dyskinésies, la pallidectomie est une procédure chirurgicale visant à léser le pallidum interne, structure suractivée chez les patients Parkinsoniens. Pratiquée de manière unilatérale, la lésion est plus rarement réalisée de manière bilatérale notamment à cause des complications induites par la double lésion (Merello et al. 2001).

La **thalamotomie** est indiquée pour les patients présentant un Parkinson sévère ne répondant pas au traitement pharmacologique. Réalisée de façon unilatérale, du côté controlatéral aux signes moteurs, elle permet principalement une amélioration des tremblements ainsi que de la qualité de vie des patients (Nijhawan et al. 2009). La lésion du thalamus est réalisée grâce à la thermocoagulation par radiofréquence. Plus récemment, le développement d'une nouvelle technique de lésions focales réalisées par ultrasons et guidées par IRM permet une atteinte plus précise et moins invasive du thalamus (Martin et al. 2009).

De nos jours, ces techniques invasives sont de plus en plus délaissées en faveur de la stimulation cérébrale profonde.

b) La stimulation cérébrale profonde

En effet, réversible et ajustable, la stimulation cérébrale profonde constitue une chirurgie de choix dans le traitement de la maladie de Parkinson. Elle consiste en l'implantation d'une électrode au sein de structures cibles comme le **thalamus**, le **pallidum interne** ou encore le **noyau sous-thalamique** (Figure 21).

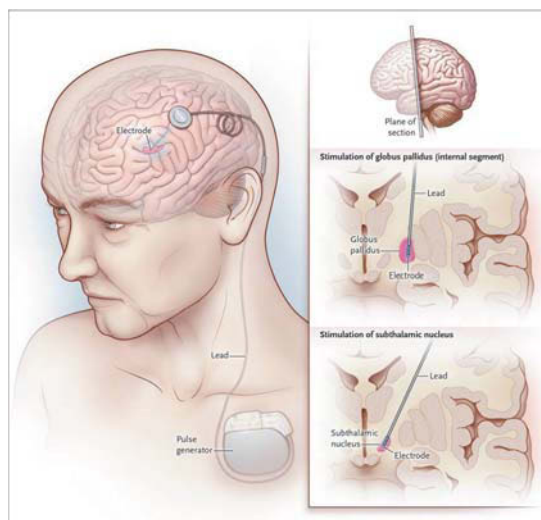


Figure 21. La stimulation cérébrale profonde chez le patient parkinsonien. Les structures ciblées sont principalement le globus pallidus ou le noyau sous-thalamique. L'électrode implantée chez le patient est reliée à un générateur électrique situé au niveau sous-clavière.

Cette stimulation des structures de sorties des ganglions de la base a pour but de normaliser la neurotransmission afin d'améliorer les troubles moteurs du patient parkinsonien. Notamment, la stimulation cérébrale profonde est indiquée pour les patients présentant des symptômes moteurs

persistants malgré la médication tels que les troubles dopa-induits, les fluctuations ON-OFF, les dyskinésies. Cette thérapie est principalement indiquée chez des patients présentant une maladie évoluée même si le mécanisme exact conduisant à l'amélioration des symptômes est peu connu.

Dès la fin des années 90, la stimulation cérébrale profonde du **noyau ventral du thalamus** a montré son efficacité dans le traitement des tremblements associés à la maladie (Rehncrona et al. 2003). Malgré le fait qu'elle soit bien tolérée par le patient (Kumar et al. 2003), la stimulation cérébrale profonde du noyau ventral du thalamus présente cependant peu d'effets sur la rigidité et la bradykinésie, symptômes communs à la majorité des patients.

Ainsi, la stimulation cérébrale profonde du **pallidum interne** sera préférée de part son action plus large sur les troubles de la maladie (Durif et al. 1999).

Introduite dans les années 90 la stimulation cérébrale profonde du **noyau sous-thalamique** elle est à l'heure actuelle la technique la plus couramment utilisée en clinique. Elle est pratiquée principalement chez des patients présentant des stades avancés de la maladie. Elle améliore la triade symptomatique ainsi que les fluctuations motrices en période OFF de traitement (Krack et al. 1997). De plus, elle permet de réduire la médication dopaminergique.

A l'heure actuelle ces techniques sont équivalentes en terme d'amélioration des symptômes même si la stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique reste préférée (Odekerken et al. 2013). De plus, de récentes recherches visent à introduire la stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique chez les malades de manière plus précoce. Des essais cliniques en phase 2 ont déjà été réalisés et montrent l'intérêt de cette stimulation dans la réduction de la médication (Charles et al. 2014).

c) Les techniques émergentes

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont actuellement en phase d'essai clinique.

La thérapie génique est l'un des domaines majeur dans lequel se concentrent actuellement les recherches. Notamment, la **greffe de cellules souches neurales** attire toute l'attention. En effet, si la perte des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson semble actuellement irréversible, une stratégie serait de remplacer ces neurones perdus par l'apport de cellules souches capables de se différencier en neurones dopaminergiques dans le but de rétablir des connections fonctionnelles au sein des noyaux gris centraux. Si des essais de thérapie cellulaire ont été abordés dès la fin des

années 1980, les résultats de ces études restent jusqu'à ce jour mitigés quand à une amélioration des symptômes (Olanow et al. 2003). Une explication de ces résultats pourrait venir de l'observation post-mortem de cerveaux de patients greffés qui montrent que les cellules implantées ont tendance à dégénérer (Hagell and Brundin 2001). Ainsi les prochains efforts devraient se focaliser sur les moyens de maintenir la viabilité des cellules greffées notamment grâce à la l'infusion de facteurs neurotrophiques comme le GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor)(Wakeman et al. 2014).

En effet, si des traitements chroniques de **GDNF** ont montré son efficacité dans la régénération des neurones dopaminergiques chez des modèles animaux de la maladie (Kirik et al. 2004), ce traitement n'a été testé que chez peu de patients en raison de sa difficulté d'administration. Le GDNF ne pouvant pas traverser la BHE seules des injections intra-cérébroventriculaires (Nutt et al. 2003) et intra-putaminales (Slevin et al. 2010) peuvent être pratiquées rendant la procédure très invasive. Ainsi, l'effet du GDNF même s'il semble prometteur reste à démontrer sur une plus grande cohorte de patients. Pour se faire, un moyen de pallier aux difficultés d'injections est d'utiliser des vecteurs viraux qui vont venir sur-exprimer spécifiquement le gène codant pour la GDNF au sein des structures cibles.

Ces **vecteurs viraux** (virus adéno-associés, lentivirus) pourraient ainsi être utilisés pour surexprimer des gènes codant pour les facteurs neurotrophiques comme le GDNF ou le NGF (Nerve Growth Factor). Récemment, des vecteurs viraux surexprimant des enzymes impliqués dans la synthèse de la dopamine (ProSavin®, Oxford BioMedica, Oxford, Royaume-Uni) (Palfi et al. 2014) ou dans la synthèse du GABA (Kaplitt et al. 2007, Lewitt et al. 2011) ont été testés avec succès dans des essais cliniques en phase 1 chez des patients parkinsonien. L'utilisation des vecteurs viraux ne se contente pas des surexprimer des gènes. Ils peuvent également « éteindre » les gènes impliqués dans la maladie. En effet, les formes génétiques de la maladie de Parkinson sont associées à une surexpression des gènes regroupés sous le nom de gènes PARK. Le « silencing » de ces gènes permettrait de ralentir la progression de la maladie.

Ce « silencing » peut également se faire grâce aux **micro-ARN**, qui pourront réguler négativement la synthèse d'alpha-synucléine afin de réduire son accumulation dans les cellules dopaminergiques.

Ces techniques constitueront peut-être l'avancée de demain dans le traitement de la maladie de Parkinson.

D. Outils d'étude de La maladie de Parkinson

1. Modèles de La MP pour l'étude de La physiopathologie de La maladie

Les modèles de la maladie de Parkinson les plus utilisés sont les modèles induits par des agents pharmacologiques neurotoxiques. Injectés de manière locale ou systémique selon la toxine et l'espèce animale choisie pour l'étude, ces agents neurotoxiques ont pour but de reproduire les changements physiologiques conduisant à l'apparition des symptômes pathologiques et des troubles comportementaux caractéristiques de la maladie.

a) Les modèles neurotoxiques

(1) Lésion 6-OHDA

La 6-hydroxydopamine (6-OHDA), analogue hydroxylé de la dopamine, est une neurotoxine très répandue dans la modélisation de la maladie de Parkinson chez l'animal. Mise en évidence dans les années 1960, son action toxique au sein du système nerveux central a été décrite pour la première fois en 1968 par Ungerstedt suite à une injection intracérébroventriculaire de 6-OHDA chez des rats Sprague-Dawley (Ungerstedt 1968). Utilisée principalement chez le rongeur, la 6-OHDA est injectée de manière stéréotaxique dans le faisceau médian du télencéphale (MFB pour *medial forebrain bundle* en anglais) ou au sein du striatum afin de produire une lésion antérograde de la SNpc ou encore directement dans la SNpc elle-même (Deumens et al. 2002) (Figure 22)

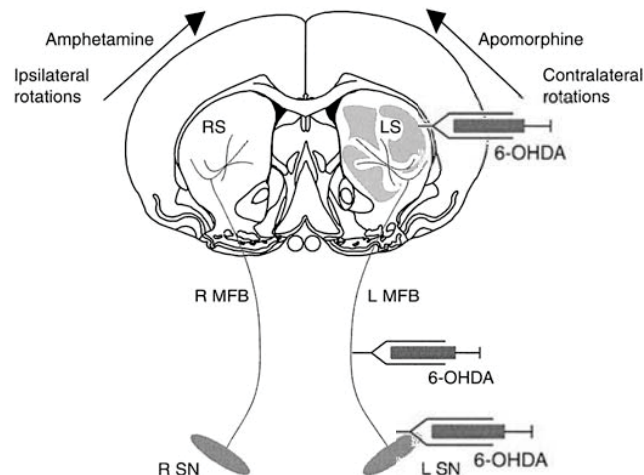


Figure 22. Lésion à la 6-OHDA.

La 6-OHDA possède une forte affinité pour le transporteur à la dopamine (DAT) et également pour le transporteur de la norépinephrine (NET) et pourra ainsi pénétrer dans les cellules dopaminergiques et noradrenergiques. Ainsi l'injection préalable d'un inhibiteur de la recapture de la norépinephrine, la desipramine, permet de léser spécifiquement les neurones dopaminergiques.

Au sein des neurones dopaminergiques, la 6-OHDA va induire un important stress oxydatif *via* différents mécanismes : 1) l'auto-oxydation de la 6-OHDA va entraîner la production de radicaux libres, 2) sa métabolisation via la monoamine oxydase (MAO) va produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), 3) elle va inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant la production de radicaux libres et une diminution de l'ATP (Figure 23). Ensemble, ces composantes liées au stress oxydatif vont conduire à l'apoptose des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée.

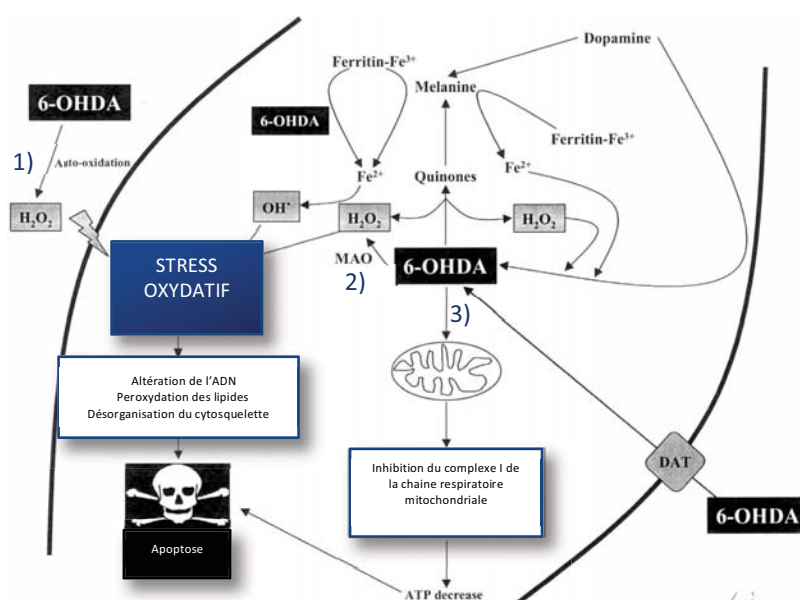


Figure 23. Mécanisme d'action de la 6-OHDA dans le cerveau. L'injection stéréotaxique de 6-OHDA au sein des structures cibles (MFB, striatum, SNpc) va induire un stress oxydatif via 3 mécanismes : 1) auto-oxydation 2) métabolisation *via* la MAO, 3) inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ensemble, ces mécanismes vont entraîner la production de radicaux libres qui vont entraîner *in fine* la mort de la cellule par apoptose. Adapté de (Deumens et al. 2002).

Son injection est généralement réalisée de manière unilatérale. Ce type de lésion induit une stéréotypie spécifique (rotation) en réponse aux drogues stimulant les récepteurs dopaminergiques (Figure 23). La lésion unilatérale est préférée à l'injection bilatérale en raison des complications (aphagie), due à la forte dénervation.

(2) Intoxication MPTP

L'histoire du **1-méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydro pyridine (MPTP)** commence en Californie au début des années 1980 chez de jeunes consommateurs de drogue s'injectant une nouvelle substance fabriquée dans un laboratoire clandestin : le 1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidine (MPPP) (Davis et al. 1979). Suite à la prise de cette drogue, de nombreuses personnes tombent malade et développent des troubles moteurs de type parkinsonien. Plus tard, il fut montré que l'apparition de ces symptômes était due à un composé dérivé du processus de synthèse du MPPP : le 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine ou MPTP (Langston et al. 1983). Ainsi, la co-administration de la drogue et de la molécule neurotoxique entraînait la dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée conduisant ainsi à l'apparition de troubles moteurs parkinsoniens.

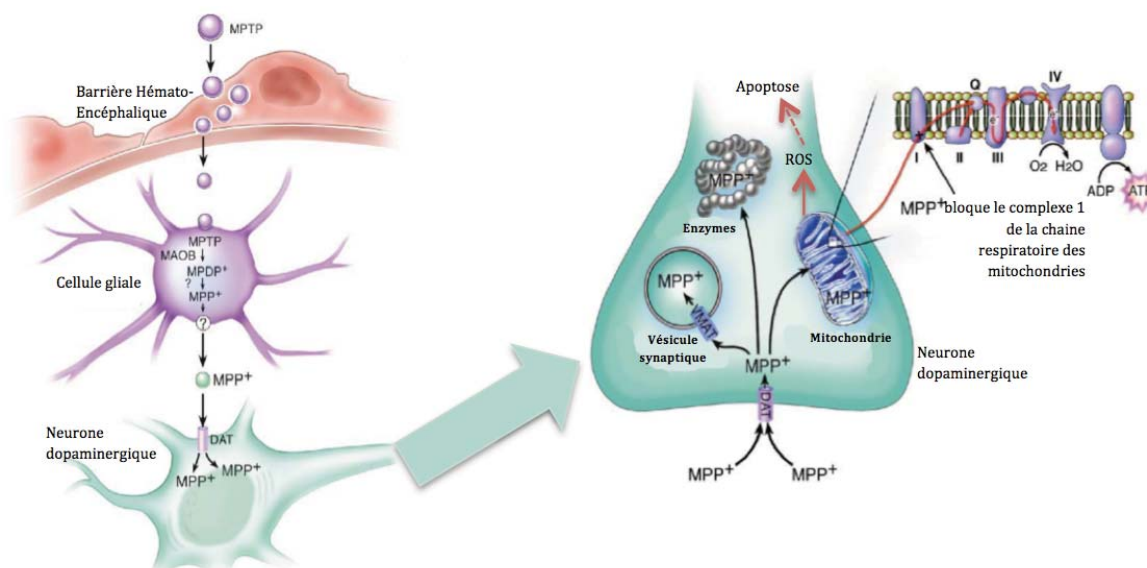


Figure 24. Mécanisme d'action du MPTP. Après injection systémique, le MPTP traverse la barrière hémato-encéphalique et pénètre à l'intérieur des cellules gliales et des neurones sérotoninergiques où il est transformé en 1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP+) par la monoamine-oxydase B (MAO-B). Puis, cette molécule est transformée en son métabolite actif : l'ion 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+). Libéré dans l'espace extracellulaire, le MPP+ est ensuite capté par neurones dopaminergiques de la SNpc via le transporteur DAT. Là, il exerce son action neurotoxique via les mitochondries. En effet, le MPP+ bloque le complexe mitochondrial I, induisant ainsi un déficit en ATP et une production excessive de radicaux libres (ROS) conduisant à un stress oxydatif et à l'activation des voies métaboliques impliquées dans la mort cellulaire programmée. Adapté de (Dauer and Przedborski 2003).

De même, l'injection systémique de MPTP chez le primate non-humain conduit également au développement de symptômes parkinsoniens. Comme chez les patients, la dégénérescence se fait préférentiellement au niveau des neurones de la voie dopaminergiques en provenance de la SNpc avec une lésion moindre de l'ATV. Il représente ainsi l'un des meilleur modèle de la maladie de

Parkinson mimant la symptomatologie, répondant aux traitements et reproduisant les complications dopa-induites. Si les premiers travaux sur ce modèle conduisaient à une lésion rapide et importante de la SNpc, les récentes études visent à reproduire la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques (s'étalant sur des années chez l'Homme) afin d'étudier les phases « pré-cliniques » de la maladie et de tester de nouvelles stratégies de neuroprotection (Bezard et al. 1997).

Le primate n'est pas le seul modèle de la maladie de Parkinson généré suite à une lésion de la SNpc par injection de MPTP. En effet, les injections de MPTP peuvent également être réalisées chez le rongeur. Si le rat est résistant aux injections périphériques de MPTP, la souris constitue un bon modèle de la maladie de part sa sensibilité au MPTP suite à des injections intra-péritonéales. Offrant l'avantage d'un moindre coût expérimental, la souris lésée par injection de MPTP reste néanmoins éloignée de la pathologie humaine. En effet, elle ne présente pas de symptômes moteurs parkinsoniens. Son utilisation est ainsi cantonnée à l'étude des mécanismes cellulaires conduisant à la mort neuronale et aux mécanismes de neuroprotection.

b) Les modèles induits par les pesticides/herbicides

(1) Le paraquat

Le **Paraquat (N,N'-diméthyl-4-4'-bipyridinium)** est un herbicide dont l'exposition confère un risque augmenté de développer une maladie de Parkinson (Liou et al. 1997).

Administré de manière systémique chez les souris, le Paraquat conduit à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc via la production excessive de radicaux libres dirigeant ainsi les cellules vers un processus de mort programmée. Si les mécanismes conduisant à la production de radicaux libres suite à l'injection de Paraquat sont mal connus, l'intérêt de ce modèle dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson réside principalement dans le fait que la dégénérescence induite est accompagnée d'inclusions d' α -synucléine et d'agrégats de type corps de Lewy (Manning-Bog et al. 2002).

De plus, il est important de souligner que l'association du Paraquat au fongicide manganèse ethylenebisdithiocarbamate (**Maneb**), potentialise les effets Paraquat sur la dénervation dopaminergique (Thiruchelvam et al. 2000). Cette observation ajoute une pierre à la théorie d'une maladie de Parkinson pouvant être induite par l'exposition aux pesticides.

(2) La roténone

Naturellement présente dans certaines plantes tropicales la **Roténone** possède une action herbicide et insecticide. Possédant une forte liposolubilité lui permettant de franchir aisément la barrière hémato-encéphalique, la Roténone agit en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Induisant un stress oxydatif, son injection intraveineuse conduit à la perte des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. Cette lésion est accompagnée d'agrégation d' α -synucléine, de formation de corps de Lewy (Cannon et al. 2009). Cependant, bien qu'elle semble bien répliquer la physiopathologie de la maladie, la roténone induirait au-delà de la dégénérescence des neurones dopaminergiques une perte non spécifique des neurones serotoninergiques, noradrenergiques et cholinergiques rendant son utilisation controversée.

Ainsi, si les modèles de la maladie de Parkinson induits par les pesticides/herbicides semblent bien refléter les modifications cellulaires ayant lieu au sein des neurones de la SNpc, ces modèles restent peu utilisés car controversés du fait de leur manque de reproductibilité

c) Modèles génétiques de la maladie

Les modèles génétiques de la maladie de Parkinson sont issus de la mise en évidence des gènes impliqués dans le développement de la maladie chez l'Homme. Notamment, le développement des modèles génétiques s'est concentré sur des gènes impliqués dans la voie ubiquitine-protéasome responsable de la formation des corps de Lewy caractéristiques de la pathologie. C'est le cas des gènes de l' **α -synucléine** et de **LRRK2** d'une part et de **PINK1/Parkin** et **DJ-1** d'autre part, qui sont impliqués respectivement dans des formes autosomales dominantes et autosomales récessives de la maladie. Cependant, si les souris transgéniques, modèles de la maladie de Parkinson, semblent reproduire par certains aspects les spécificités de la maladie (inclusion de corps de Lewy), ces modèles restent néanmoins éloignés de la pathologie humaine car ils ne provoquent pas de dégénérescence de la voie nigro-striée.

Récemment, de nouveaux modèles de la maladie induits par des **vecteurs viraux exprimant l' α -synucléine** ont vu le jour chez le rat. Ces modèles, plus proches de la physiopathologie humaine, présentent des inclusions d' α -synucléine accompagnées d'une perte sélective des neurones

dopaminergiques et sont dotés des caractéristiques comportementales propres à la maladie (Kirik et al. 2002).

En conclusion, de nombreux modèles animaux de la maladie de parkinson ont été mis au point dans le but de mieux comprendre la pathologie et de tester de nouveaux agents thérapeutiques. Si chaque modèle présente des avantages et des inconvénients, il semble difficile de modéliser totalement la maladie dans un seul modèle animal. Néanmoins une des pistes à envisager pour le futur serait de coupler les modèles génétiques aux modèles neurotoxiques afin de prendre en compte les facteurs environnementaux intervenant dans le développement de la maladie comme il semblerait que ce soit le cas l'Homme.

E. Outils de diagnostique de La maladie de Parkinson

1. Diagnostique de La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie lentement évolutive avec une apparition des premiers symptômes moteurs après plus de 80% de dénervation dopaminergique. Cette caractéristique de la maladie souligne la difficulté à diagnostiquer la maladie à un stade précoce en amont des premiers troubles gênants. Ainsi le diagnostique de la maladie de Parkinson est principalement basé sur l'évaluation clinique des signes moteurs même si l'évolution des connaissances sur les symptômes non-moteurs suggère la possibilité d'un diagnostique en amont des premiers signes moteurs.

Les troubles observés dans la maladie de Parkinson sont souvent confondus avec d'autres syndromes parkinsoniens résultant à une reclassification après évaluation post-mortem d'environ 10% des patients diagnostiqués pour une MPI au cours de leur vie (Hughes et al. 2001).

Ainsi, l'erreur de diagnostique des patients primo-consultants pour une maladie de Parkinson est élevée. A 5 ans de maladie on estime le diagnostique correct dans 65% des cas. Cette valeur monte à 76% à 12 ans de maladie (Rajput et al. 1991).

L'examen clinique est basé essentiellement sur la recherche des 4 signes cardinaux caractéristiques de la maladie à savoir: le **tremblement de repos**, la **rigidité**, l'**akinésie** et la **bradykinésie** et l'**instabilité posturale**. L'évaluation de ces différents signes cliniques est principalement réalisée à

l'aide **d'échelles cliniques dédiées** telle que l'UPDRS. Si des **techniques d'imagerie** permettent la visualisation de la perte dopaminergique typique de la maladie, celles-ci restent onéreuses et de ce fait sont des outils peu utilisés dans le diagnostic de la maladie. La **validation post-mortem par immunohistochimie** reste à l'heure actuelle le seul examen neuro-pathologique post-mortem pouvant apporter la preuve du diagnostic.

a) Les échelles cliniques pour la pratique clinique courante

Les symptômes de la maladie de Parkinson sont évalués par différentes échelles cliniques.

L'UPDRS (Unified Parkinson Disease Rating Scale) est l'échelle la plus couramment utilisée dans le monde pour le diagnostic de la maladie de Parkinson. Simple d'utilisation, elle recouvre toutes les situations cliniques qui peuvent être observées. Elle est organisée en six sections (comportant un certain nombre d'items) utilisables séparément (Annexe 1).

- Section I : état mental, comportemental et thymique (4 items)
- Section II : activités de la vie quotidienne (13 items)
- Section III : examen moteur (14 items)
- Section IV : complications du traitement dans la semaine précédant l'examen (11 items)
- Section V : stades de Hoehn et Yahr qui permettent de classer les patients en 8 niveaux, selon la gravité de leur maladie (stade 0 absence de signe Parkinsonien — stade 6 perte totale d'autonomie).
- Section VI : échelle d'activité de la vie quotidienne de Schwab et England en pourcentage d'activité de 100% (patient totalement indépendant) à 0% (patient alité), selon un barème préétabli.

La réactivité du patient au traitement L-dopa est également mesurée par cette échelle avec une évaluation motrice en OFF de traitement dopaminergique puis en ON après prise de L-dopa.

Cette échelle est généralement couplée avec l'échelle de **Hoehn et Yard** (1967) qui évalue de 0 à 5 le stade de la PMI (0=normal, 5=grabataire). Même si cette dernière reste peu sensible, elle permet un classement fiable des patients (Annexe 2).

b) Evaluation in-vivo de la maladie grâce aux techniques d'imagerie

(1) SPECT

La SPECT (Single-Photon Emission Computerized Tomography), est l'une des techniques utilisées pour évaluer la dénervation dopaminergique. Le premier traceur utilisé dans le but de diagnostiquer la maladie de Parkinson est l'**IBZM** (Iodine-123 labelled 3-iodo-6-methoxybenzamide). C'est un ligand des récepteurs D₂. Une baisse du marquage IBZM est observée dans le striatum de patients présentant des troubles de type parkinsonien comparé à des patients ayant une maladie de Parkinson.

Également utilisés en clinique, on retrouve des ligands SPECT des terminaisons dopaminergiques au niveau pré-synaptique. Parmi ces ligands, deux sont fréquemment utilisés : le **bêta-CIT** et le **FP-CIT (DaTSCAN)**. Ces marqueurs s'associent au transporteur de la dopamine (DAT) sur les terminaisons nerveuses de la voie nigrostriée. Ainsi, une baisse asymétrique de marquage striatal du DAT peut être identifiée par cette technique et ce même à des stades précoces de la maladie (Scherfler et al. 2007; Ziebell et al. 2012; Nissen et al. 2014).

Cependant cette technique reste peu sensible en comparaison de la tomographie par émission de positons (TEP) pour la discrimination des troubles parkinsoniens (Hellwig et al. 2012).

(2) Tomographie par Emission de Positrons (TEP)

L'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positrons) constitue un autre moyen d'évaluer le statut dopaminergique des patients parkinsoniens. En effet, des marqueurs tels que la ¹⁸F-DOPA permettent le suivi de la réduction de la capture pré-synaptique de la dopamine au niveau du Pu. De plus, la réduction observée est corrélée à la durée d'évolution et à la sévérité de la maladie (Nurmi et al. 2001; Pavese et al. 2011). D'autres marqueurs sont également disponibles comme le ¹¹C raclopride (ligand des récepteurs D₂).

Si ces techniques semblent bien refléter les changements ayant lieu dans la maladie de Parkinson, leur coût élevé limite leur utilisation clinique de routine. Ainsi les techniques de RMN, outils

largement utilisés pour le diagnostique clinique de nombreuses maladies (Pavese and Brooks 2009) **semblent être une bonne alternative.**

(3) Imagerie et spectroscopie par résonance magnétique

Si **l'imagerie par résonance magnétique (IRM)** classique ne permet pas de visualiser de changements morphologiques majeurs au niveau du système nerveux central, certaines techniques comme la relaxométrie semblent prometteuses dans le diagnostique de la maladie. C'est le cas notamment des études sur les changements en fer dans la substance noire des patients. En effet, de récents travaux ont montré une augmentation du temps de relaxation transverse **R2*** (Martin et al. 2008; Ulla et al. 2013) en relation avec la sévérité de la maladie dans une étude longitudinale (Ulla et al. 2013). De plus, cette technique semble prometteuse dans la distinction de patients parkinsoniens et de patients souffrant d'atrophie multiples (Focke et al. 2011; Lee et al. 2013). Cependant, d'autres études devront confirmer ces premiers résultats.

La **Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)** quand à elle permet la mesure des concentrations en métabolites cérébraux dans une structure d'intérêt. Si les précédentes études de SRM du proton (^1H) menées sur des modèles animaux de la maladie ont révélées des modifications biochimiques (modification des concentrations en glutamate, glutamine et GABA) dans des structures comme le striatum, les résultats obtenus chez l'Homme restent controversés. C'est sur ce point que va être développée la seconde partie de ce manuscrit.

Partie II



Imagerie non-invasive de
La maladie de Parkinson

....des techniques
couramment utilisées en
clinique vers les
technologies de demain...

II. Imagerie non-invasive de La maladie de Parkinson

A. La résonance magnétique nucléaire

Le phénomène de **résonance magnétique nucléaire (RMN)** est identifié pour la première fois en 1945 par les travaux indépendants de **Felix Bloch** et de **Edward Purcell** (Bloch 1946; Purcell et al. 1946) qui leurs valurent l'obtention du prix Nobel en 1952 (Figure 25). Depuis cette première découverte, la RMN a connu d'incroyables développements, motivés par la diversité des ses applications tant en physique fondamentale qu'en clinique à partir des années 1980.

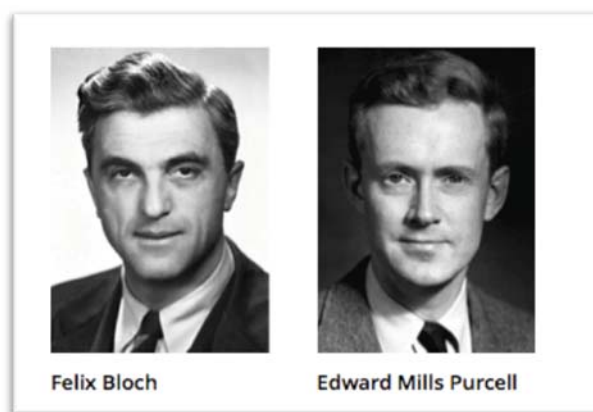


Figure 25. Felix Bloch et Edward Mills Purcell, prix Nobel de physique en 1952 pour leurs travaux sur la RMN.

Dans le domaine de la biologie et de la médecine, la RMN est une technique d'imagerie anatomique et moléculaire non invasive. Il existe 2 applications majeures à la résonance magnétique nucléaire : **l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)** et la **Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM)**. L'IRM est une technique non invasive permettant une bonne visualisation des tissus *in vivo* et permettant ainsi en médecine de poser rapidement un diagnostic. Elle repose sur la détection du signal des protons de l'eau contenue dans les tissus. La SRM, quant à elle, est une technique permettant l'analyse moléculaire des tissus *in vivo*. Elle représente une source importante d'information dans la visualisation et/ou la compréhension des changements métaboliques dans un tissu sans recours à un procédé invasif.

D'un point de vue fondamental, la RMN consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux d'une molécule sous l'action conjointe de 2 champs magnétiques : un champ statique fixe élevé (B_0) et un champ électromagnétique tournant (B_1).

En effet, le phénomène de RMN repose sur une propriété intrinsèque des spins nucléaires, à savoir leur capacité d'aimantation dans un champ magnétique. Le spin peut être associé à une sphère chargée positivement et tournant sur elle-même dans un champ magnétique donné.

En l'absence de champ magnétique, les spins nucléaires d'un échantillon seront orientés de façons aléatoires dans toutes les directions (Figure 26). Si cet échantillon est soumis à un champ magnétique donné (B_0), les protons vont alors s'orienter selon un vecteur d'orientation macroscopique, en sens parallèle ou antiparallèle, avec un certain angle appelé angle de précession défini par l'équation de Larmor :

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

où ω_0 est la fréquence angulaire de précession qui est proportionnelle à B_0 , le champ magnétique et dépendant de γ qui est le rapport gyromagnétique spécifique de chaque noyau. Cette équation constitue une notion de base en RMN à savoir que chaque type de noyau est associé à une fréquence de résonance dont la valeur ne dépend que de l'intensité du champ magnétique externe.

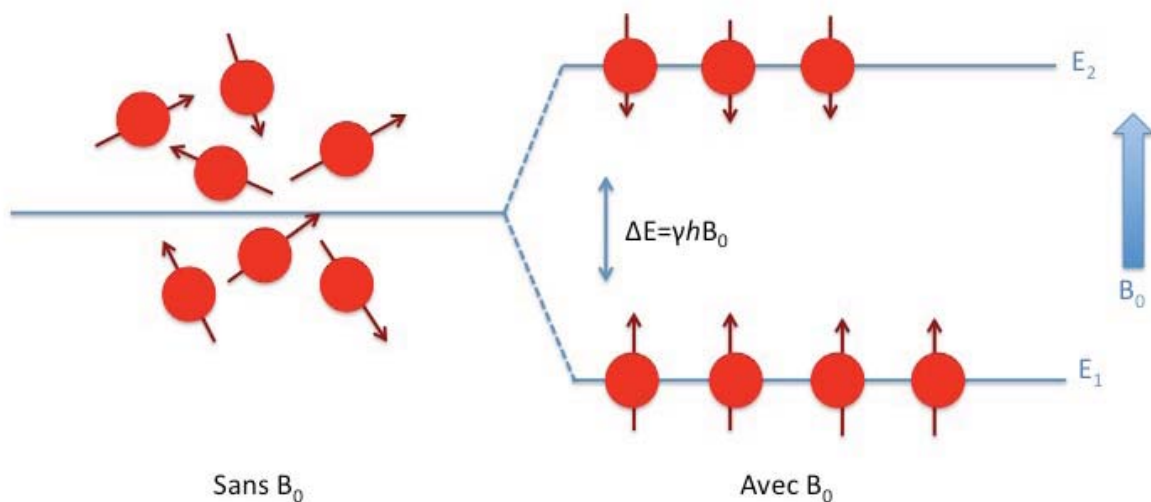


Figure 26. Répartition de la population d'un système de spins $\frac{1}{2}$ après application du champ magnétique B_0 . ΔE = différence entre les niveaux d'énergie E_1 et E_2 ; γ = rapport gyromagnétique; h = constant de Planck ($6,62 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); B_0 = intensité du champ magnétique.

Si nous revenons à notre champ magnétique fixe B_0 , la répartition des protons dans le sens parallèle ou antiparallèle n'est en réalité pas tout à fait équivalente. En effet, selon la statistique de Boltzmann, l'orientation parallèle associée au niveau de plus basse énergie est favorisée. C'est cette

différence qui va être à l'origine de l'apparition d'un vecteur d'aimantation macroscopique (M_z) dans le sens de B_0 .

Cet état d'équilibre dans un champ magnétique peut être perturbé par un apport d'énergie via une onde de radiofréquence (RF) (ou champ magnétique tournant, B_1). Cet apport d'énergie va permettre la transition des spins d'un niveau d'énergie à un autre entraînant ainsi une modification de l'aimantation macroscopique (M_z) dans un plan transverse (M_{xy}) illustrée en Figure 27 et 27.

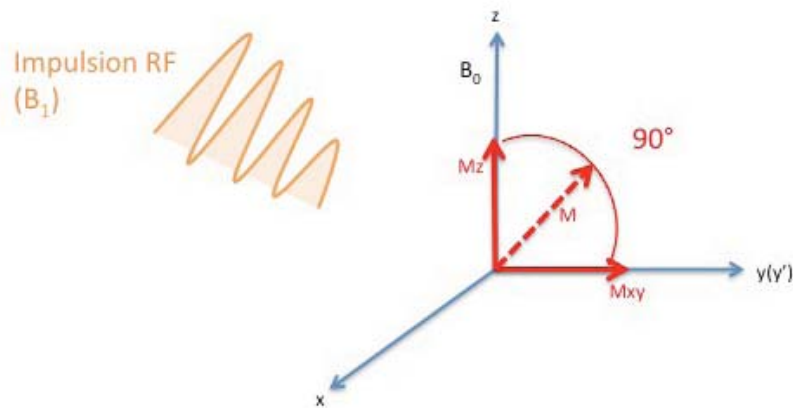


Figure 27. Effet des impulsions RF sur le vecteur d'aimantation macroscopique. Une impulsion de 90° entraîne un basculement de M dans le plan xOy .

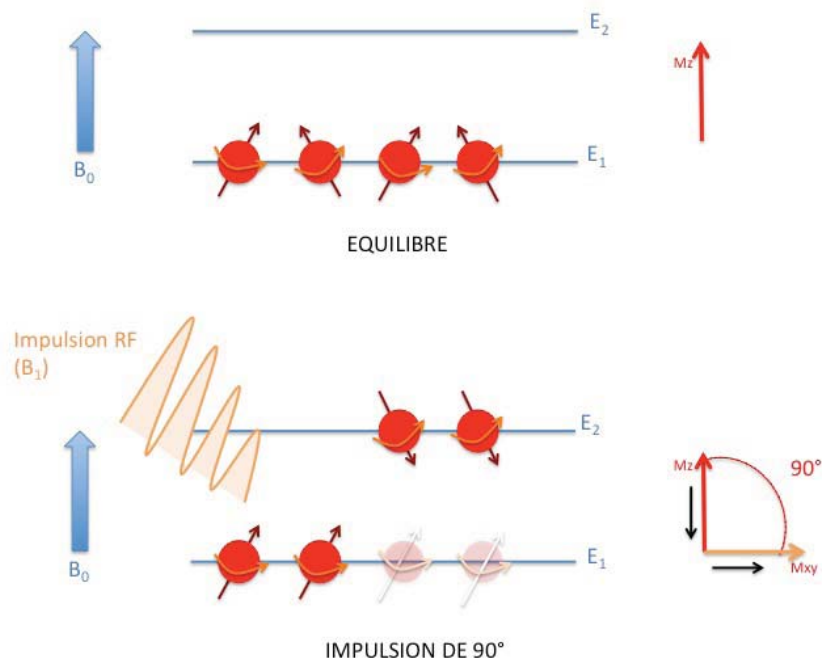


Figure 28. Effet des impulsions RF sur le vecteur d'aimantation macroscopique: représentation des spins. Les spins en surnombre à l'équilibre dans un champ fixe B_0 vont être responsable d'une aimantation M_z représentée par la flèche rouge. L'impulsion RF provoque des transitions énergétiques des niveaux E_1 à E_2 et un rephasage des spins. Lorsque les spins en surnombre sont passés au niveau énergétique supérieur, on a une égalisation des populations sur les deux niveaux d'énergie ainsi M_z devient nul et M_{xy} est maximal. (Kastler et al. 2011).

La perturbation du système de spins ainsi réalisée conduit à un phénomène de résonance à l'issue duquel le vecteur d'aimantation est écarté de sa position d'équilibre d'un angle dont la valeur dépend de la durée de l'impulsion RF. Cette dernière va induire une égalisation des spins sur les deux niveaux d'énergie et la mise en phase des spins conduisant à la disparition de M_z (ou aimantation longitudinale) et à l'apparition de l'aimantation M_{xy} (aimantation transverse).

Puis, suite à son basculement dans l'angle sous l'impulsion de l'onde de radiofréquence, le vecteur d'aimantation va tendre à retrouver son état stable c'est-à-dire à retourner vers B_0 , c'est le phénomène de relaxation. La relaxation va se faire selon les deux axes : 1) selon M_z , c'est la relaxation longitudinale ou relaxation T_1 , 2) selon M_{xy} c'est la relaxation transverse ou relaxation T_2 (Figure 29).

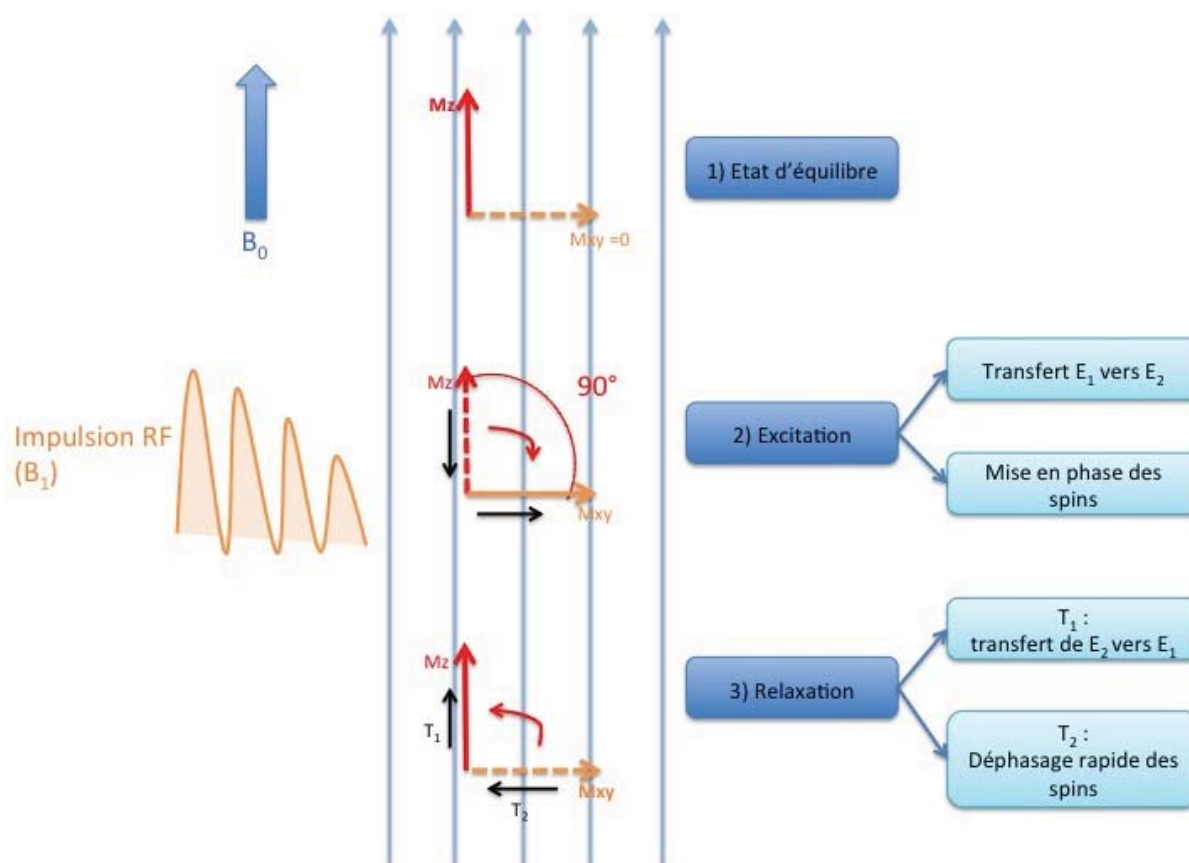


Figure 29. Schéma récapitulatif des interactions entre les ondes RF et les spins placés dans un champ magnétique fixe B_0 (Kastler et al. 2011).

Le signal recueilli en RMN correspond à la décroissance de l'aimantation transversale. On parle de signal de précession libre ou FID. Il se présente sous la forme d'une superposition de sinusoides amorties. Chacune d'elle correspond à une des raies du spectre. Le FID, qui est un signal temporel, est ensuite transcrit dans le domaine fréquentiel à l'aide de la Transformée de Fourier sous la forme d'un spectre. Chaque fréquence de résonance traduite ainsi va correspondre à un groupement chimique qui sera caractérisé par son déplacement chimique. L'information recueillie permet ainsi d'évaluer la composition chimique d'un tissu.

De nombreux noyaux atomiques peuvent être suivis en SRM (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Cependant, le faible rapport gyromagnétique γ observé pour certains noyaux limite les capacités de détection du signal pour certains atomes et donc leur sensibilité de détection en RMN (Tableau 1. Caractéristiques des atomes ^1H , ^{13}C , ^{15}N pour l'étude en SRM.)

Tableau 1. Caractéristiques des atomes ^1H , ^{13}C , ^{15}N pour l'étude en SRM.

Noyau	Rapport gyromagnétique γ ($\times 10^{-7} \text{ T}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$)	Abondance naturelle du noyau (%)	Sensibilité relative par rapport au noyau ^1H (pour un champ constant avec un même nombre de noyaux)	Sensibilité absolue (produit de la sensibilité relative et de l'abondance naturelle)	Fréquence de résonance à 14,1T (MHz)
^1H	26,75	99,9	1	1	600
^{13}C	6,73	1,1	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$	60
^{15}N	-2,71	0,4	$1,0 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-6}$	150

B. La spectroscopie du proton

1. Généralités

La SRM du ^1H représente la technique de SRM la plus largement utilisée à l'heure actuelle en clinique. Elle convient notamment parfaitement à l'analyse du statut métabolique cérébral à un temps donné.

Le corps humain est composé d'une quantité de d'eau importante (65%) conduisant à une forte concentration de molécules d'eau (H_2O) et donc des protons (en moyenne: 80mol/L) dans l'organisme. Ainsi le signal recueilli en SRM comportera majoritairement le signal de résonance des ^1H contenus dans l'eau. Afin de discriminer les groupements chimiques de métabolites d'intérêt en concentration moindre dans l'organisme, le signal de l'eau devra être sélectivement éliminé.

De plus, les métabolites observables en SRM du ^1H dépendent des stratégies d'acquisition du signal utilisées. En effet, le temps de relaxation de chaque métabolite varie. En particulier, certains métabolites ne seront observés qu'à temps d'écho court. C'est notamment le cas pour le glutamate, la glutamine et le myo-inositol (M-Ins).

La SRM s'utilise en mode « monovoxel », qui interroge une seule région d'intérêt à la fois, où en mode « multivoxel », dans lequel une large région est sélectionnée, région ensuite sub-divisée par une technique d'imagerie. La première technique (la plus ancienne des deux) a pour objectif d'acquérir un spectre unique provenant d'un petit volume bien défini et positionné à un endroit précis de l'échantillon étudié. Pour obtenir une localisation 3D du volume d'intérêt, des gradients de champ magnétique sont appliqués dans les trois directions orthogonales (x , y et z). Ainsi différentes séquences d'acquisition du signal existent. Ce sont principalement les séquences de type **PRESS** (*Point RESolved Spectroscopy* en anglais) ou **STEAM** (*STimulated Echo Acquisition Mode* en anglais). La représentation des données s'effectue sous forme d'un spectre indiquant la répartition et l'amplitude des composés observés dans la zone d'intérêt.

Contrairement à la spectrométrie localisée, le principal avantage de l'imagerie spectrométrique par résonance magnétique (ISRM) est d'acquérir simultanément des images reflétant la quantification régionale (cartes de distribution métabolique) d'un ou plusieurs métabolites, provenant de plusieurs régions adjacentes. Contrairement à l'IRM, les données spectrométriques doivent être acquises en présence d'un champ magnétique B_0 homogène et donc en l'absence de gradient de lecture. En conséquence, un gradient de codage de phase est nécessaire pour chaque dimension spatiale. Après transformée de Fourier dans les 3 dimensions spatiales, un spectre est obtenu pour chacun des voxels. Enfin, après traitement des spectres à l'aide d'un logiciel spécialisé qui permet de déterminer l'intensité de chaque pic du spectre, on obtient une cartographie de distribution pour chaque métabolite. Son inconvénient provient du temps d'acquisition qui augmente avec la résolution spatiale.

2. Métabolites observables

Sur une acquisition de SRM du ^1H à temps d'écho court, et après suppression du signal de l'eau, on identifie majoritairement les composés suivants:

- **Le N-acétylaspartate (NAA)** à 2,01ppm (Govindaraju et al. 2000). Il est le composé présentant la plus grande amplitude dans le cerveau sain. Localisé exclusivement dans les

neurones, il est souvent utilisé comme marqueur de l'intégrité neuronale (Moffett et al. 1991; Moffett et al. 2007). La synthèse de NAA a lieu au sein mitochondries (Patel and Clark 1979). Les quantités de NAA seraient liées au métabolisme énergétique des neurones (production d'ATP) (Benarroch 2008). On retrouve associé au pic du NAA le signal du N-acetylglytamate, on parle alors de NAA total (tNAA).

- **La glycérophosphocholine (GPC) et la phosphocholine (Pch)** sont retrouvées regroupés à 3,22ppm. Ainsi, elles sont fréquemment exprimées en le terme de choline totale (tCho). Ces composés sont impliqués dans la composition des phospholipides membranaires. Les variations de concentrations en Cho reflètent alors des changements de densité cellulaire comme dans les tumeurs par exemple.
- **La créatine (Cr) et la phosphocréatine (PCr)** à 3,03ppm et 3,93ppm. La Cr est impliquée dans le métabolisme énergétique de la cellule et sera donc utilisée comme un marqueur du statut énergétique (Andres et al. 2008). La créatine est souvent utilisée comme référence pour le calcul des rapports métaboliques. Cependant, les résultats de cette quantification relative à la Cr doivent être interprétés avec précaution, des variations inter-régionales pouvant avoir lieu dans le cerveau notamment en présence d'une pathologie (Connelly et al. 1994). Afin de prévenir ce biais, la quantification des métabolites peut-être réalisée en utilisant le signal de l'eau comme référence (Jansen et al. 2006).
- **Le myo-inositol (M-Ins)** à 3,6ppm. Le M-Ins est un métabolite qui n'est observé qu'à des temps d'écho courts. On retrouve principalement le M-Ins dans les astrocytes et les cellules microgliales, faisant de cette molécule un marqueur potentiel des cellules gliales (Brand et al. 1993). Bien que ces fonctions soient peu connues, le M-Ins serait impliqué dans l'osmorégulation et représenterait une forme de stockage du glucose dans le cerveau. (Ross 1991). Des variations de la concentration en M-Ins sont notamment retrouvées dans les hépato encéphalopathies (Kierans et al. 2014) et dans la maladie d'Alzheimer (Targosz-Gajniak et al. 2013).
- **Le glutamate et la glutamine.** Ils forment un pic composé de multiplets dont le déplacement chimique se situe entre 2 et 2,5ppm. Les résonances du glutamate et celles de la glutamine sont très proches les unes des autres ce qui explique la difficulté de les différencier à bas champ. Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur présent dans le cerveau. Sa dégradation et son recyclage font intervenir la synthèse de glutamine dans les astrocytes.
- **Les lipides et macromolécules** entre 0 et 2ppm. Leurs augmentations reflètent des dommages membranaires cellulaires.

D'autres métabolites sont également potentiellement détectables en SRM du ^1H . C'est le cas du scyllo-Inositol, du glucose, de l'alanine, de l'aspartate, de la glycine, de la taurine, de la thréonine et du GABA. Ces métabolites ne seront visibles qu'après une édition spécifique de leur résonance, comme par exemple pour le GABA (pour revue voir (Puts and Edden 2012)).

D'autres ne seront visibles qu'en situation pathologique. C'est le cas du lactate, révélateur du métabolisme anaérobie, dont la concentration augmente dans les tissus tumoraux et suite à des ischémies cérébrales (Goergen et al. 2014).

3. Utilisation de La ^1H MRS pour L'évaluation du métabolisme dans La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson résulte de la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc. Cette perte des neurones dopaminergique entraîne des modifications du microenvironnement neuronal dans la SNpc et également dans sa structure de projection, le striatum comme montré dans les études anatomiques, électrophysiologiques et biochimiques (Calabresi et al. 1996; Blandini et al. 2000; Jonkers et al. 2002). Ces études suggèrent notamment une altération de la relation neurone-glie dans cette structure après dénervation dopaminergique.

Face à ces observations, la SRM du ^1H est un moyen non invasif de suivre *in vivo* les modifications biochimiques qui ont lieu dans cette maladie.

En accord avec les hypothèses de modification de l'interaction neurone-glie, la littérature sur les travaux de SRM du ^1H réalisés dans le striatum d'animaux modèles de la maladie de Parkinson ont montré une augmentation significative des taux de glutamate, glutamine et GABA dans le striatum suite à la dénervation dopaminergique (Chassain et al. 2008; Bagga et al. 2013; Chassain et al. 2013). De plus, il a été montré que le traitement à la L-dopa restaure ces concentrations (Chassain et al. 2010; Bagga et al. 2013). Ainsi, l'évaluation des concentrations de ces métabolites par SRM du ^1H chez l'Homme pourrait apporter une information clef permettant 1) de diagnostiquer la maladie et 2) d'évaluer la réponse aux traitements. Cependant, ces résultats n'ont jusque là pas été retrouvés dans les études chez les patients parkinsoniens.

En effet, si les études réalisées par SRM du ^1H ont révélé des altérations neurochimiques dans le Pu des patients atteint de la maladie de Parkinson, notamment des modifications du rapport NAA/tCr, les résultats obtenus restent contradictoires d'une étude à l'autre. Alors que des travaux montrent une diminution du rapport NAA/tCr (Abe et al. 2000) d'autres études n'observent aucune

modification (Davie et al. 1995; Federico et al. 1997; Guevara et al. 2010; Watanabe et al. 2004). L'évaluation des concentrations en glutamate et glutamine à temps d'écho court ne révèle pas de modifications dans le Pu entre sujet sain et sujet parkinsonien (Kickler et al. 2007; Emir et al. 2012). Seule une étude à très haut champ a montré des concentrations plus élevées en GABA dans la maladie de Parkinson par rapport à des sujets sains (Emir et al. 2012). De plus, l'étude de la réponse thérapeutique une prise aiguë de L-dopa, n'a montré aucun changement métabolique en NAA, tCho et tCr (Kickler et al. 2007).

Néanmoins, cette contradiction apparente des résultats obtenus par SRM du ^1H chez l'Homme peut s'expliquer par l'hétérogénéité des groupes de patients (Levin et al. 2014). En effet, dans ces études, les mesures étaient réalisées sur des patients parkinsoniens à différents stades d'évolution de la maladie et sous des degrés variables de médication. Cette hétérogénéité clinique représente sans doute un facteur clef dans l'explication des différences observées entre les études.

Ainsi, le premier projet de recherche de ce travail de thèse vise à étudier les modifications métaboliques par SRM du ^1H dans un groupe homogène de patients. Afin de déterminer l'effet de la médication sur le métabolisme cérébral, les patients seront étudiés à jeun de traitement dopaminergique et après une prise aiguë de L-dopa à l'aide d'un design randomisé en cross-over.

Nous venons de voir que dans ce paragraphe que la SRM du ^1H présente l'avantage d'être une technique permettant l'appréciation qualitative et quantitative d'un certain nombre de métabolites dans le cerveau en pratique clinique courante. Cependant cette technique reste peu informative en comparaison de la SRM du ^{13}C , les principaux cycles métaboliques cellulaires d'intérêt étant des cycles carbonés. Bien qu'elle soit intrinsèquement moins sensible que la SRM du ^1H , le développement de nouvelles technologies de polarisation des molécules de ^{13}C a permis l'avènement de la SRM pour le suivi en temps réel des cycles métaboliques. Ces nouvelles technologies constitueront, peut-être, demain, les nouvelles stratégies d'imagerie diagnostique chez l'Homme.

C. Spectroscopie du ^{13}C

1. Avantages et Limitations... mais ça c'était avant !

La **SRM du carbone ^{13}C** , est une technique analytique majeure de part les informations détaillées qu'elle apporte concernant la structure moléculaire, les interactions intra et intermoléculaires et les informations dynamique sur les flux métaboliques. Disposant d'une grande largeur spectrale, la SRM du ^{13}C permet la visualisation d'un grand nombre de métabolites.

Cependant, malgré son potentiel la SRM du ^{13}C reste une technique peu sensible. En effet, l'intensité du signal détecté est proportionnelle à la polarisation des spins nucléaires qui dépend elle-même de la différence des populations de spins entre deux niveaux d'énergie quantiques. Or à l'équilibre thermique cette polarisation est faible pour les noyaux d'intérêt métabolique tel que le ^{13}C . Le signal ^{13}C recueilli est 10^4 fois plus petit que celui du ^1H . De plus, la faible abondance naturelle du ^{13}C dans le corps humain (1,1%) rend la SRM du ^{13}C difficile à mettre en œuvre en comparaison de la SRM du ^1H pour lequel l'abondance naturelle avoisine les 100%. Ainsi, les expériences conduites en SRM du ^{13}C recourent à un enrichissement isotopique du ^{13}C (on passe alors de 1,1% à 99,9% d'enrichissement) afin d'augmenter le signal. Cependant, malgré l'enrichissement, la SRM du ^{13}C requiert des temps d'acquisition importants (de plusieurs minutes à des heures) et des infusions prolongées de substances marquées au ^{13}C entraînant des coûts élevés et des applications difficiles à mettre en œuvre chez l'Homme.

Les études en SRM du ^{13}C se font donc principalement chez des modèles animaux de pathologies. L'injection de produits marqués au ^{13}C et la mesure de l'incorporation de ces éléments par SRM permet la détermination de nombreux flux métaboliques cérébraux *in vivo* tels que le cycle tricarboxylique ou encore le cycle glutamate/glutamine. Dans le cerveau, le choix du précurseur marqué permettra de suivre soit le métabolisme ayant lieu dans les neurones soit celui ayant lieu dans les astrocytes. En effet, le glucose étant la source privilégiée d'énergie pour les neurones, l'infusion de $[1,6\text{-}^{13}\text{C}_2]$ glucose permettra le suivi du métabolisme neuronal. De la même manière, l'injection de $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ acétate permettra le suivi du métabolisme dans les cellules astrocytaires (Deelchand et al. 2009).

Dans le cadre de la maladie de Parkinson, les expériences de SRM du ^{13}C ont été principalement réalisées chez le rongeur modèle de la maladie. Notamment, une augmentation du marquage du glutamate en C4 a été montrée chez des rats lésés de manière unilatérale par une injection de 6-

OHDA comparé à des animaux contrôle suite à une perfusion de [2-¹³C] sodium acétate (Chassain et al. 2005). Cette étude met en évidence des changements biochimique en faveur d'une modification du cycle glutamate-glutamine dans le striatum dans la maladie de Parkinson. Dans un travail récent, Bagga et al. montrent également une altération du métabolisme énergétique chez la souris après intoxication au MPTP (Bagga et al. 2013). Ils montrent une augmentation de l'activité gliale au niveau du striatum après dénervation dopaminergique qui est temporairement normalisée après traitement à la L-dopa. Ainsi, ces travaux en SRM du ¹³C, couplés aux résultats obtenus en électrophysiologie, microdialyse ou SRM du ¹H vont dans le sens d'un rôle important du cycle glutamate-glutamine dans la pathologie parkinsonienne. Cependant, l'obstacle en terme de sensibilité de la SRM du ¹³C et donc de terme de temps d'acquisition rend l'utilisation de cette technique peu informative pour l'étude de cycle. En effet, la durée d'acquisition fait perdre l'aspect dynamique du suivi de ce flux.

Afin pallier au manque de sensibilité de la RMN, de nouvelles techniques dont le but est d'augmenter le signal RMN ont vu le jour.

2. Emergence d'une nouvelle technique de spectroscopie RMN pour la visualisation du métabolisme: L'hyperpolarisation du ¹³C

a) Bases de L'hyperpolarisation du ¹³C

(1) Principe

Une des stratégies pour augmenter la sensibilité magnétique du ¹³C repose sur la création d'une population de spins ne répondant pas à l'équation de Boltzmann : c'est l'**hyperpolarisation**. Cette notion se réfère à la capacité d'une molécule à être hyperpolarisée dans un champ magnétique donné en créant artificiellement une distribution non homogène des spins nucléaires entre deux niveaux d'énergie comparée à leur distribution à l'équilibre thermique (Figure 30).

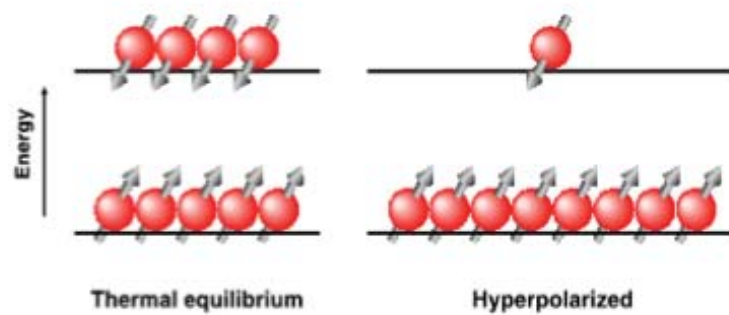


Figure 30. Description du principe de l'hyperpolarisation. La polarisation repose sur la création artificielle d'une répartition non homogène des spins des atomes entre 2 niveaux d'énergie (à droite) permettant la détection d'un signal plus intense en RMN comparé à l'équilibre thermique (à gauche).

La polarisation entre deux niveaux d'énergie est définie à l'équilibre thermique par **l'équation de Boltzmann** (Figure 31):

$$P = \frac{N_{\alpha} - N_{\beta}}{N_{\alpha} + N_{\beta}} = \tanh\left(\frac{\gamma \hbar B_0}{2k_B T}\right)$$

The diagram shows the equation with four boxes connected to it: 'Rapport gyromagnétique' (green box) points to γ ; 'Champ magnétique' (red box) points to B_0 ; 'Température' (blue box) points to T ; and 'Polarisation' (orange box) points to P .

Figure 31. Equation de Boltzmann.

Dans cette formule, on voit bien que la différence de population entre deux niveaux d'énergie, c'est-à-dire la polarisation, est dépendante de la température (T), du champ magnétique (B_0) et de rapport gyromagnétique (γ). Ainsi, la polarisation sera d'autant plus importante dans un champ magnétique élevé, à basse température pour des éléments chimiques disposant d'un rapport gyromagnétique élevé. On comprend donc facilement que les électrons, de par leur rapport gyromagnétique élevés ($\gamma_e = 28034,95 \text{MHz.T}^{-1}$) sont de bons candidats pour la polarisation en comparaison des noyaux atomiques comme le ^1H ($\gamma_{1\text{H}} = 42,5774 \text{MHz.T}^{-1}$), le ^{13}C ($\gamma_{13\text{C}} = 10,7083 \text{MHz.T}^{-1}$) ou le ^{15}N ($\gamma_{15\text{N}} = 4,3172 \text{MHz.T}^{-1}$). L'idée de transférer la polarisation de ces électrons vers les noyaux atomiques disposant d'un nombre de spin non nul a ainsi été proposée.

Les dernières avancées réalisées sur les différentes techniques de transfert de polarisation des électrons vers des noyaux d'intérêt, ont permis d'augmenter de manière remarquable le signal détecté en RMN. Différentes techniques d'hyperpolarisation pour une détection *in vivo* existent et sont décrites dans le paragraphe suivant.

b) Les différentes techniques d'hyperpolarisation

Parmi les techniques d'hyperpolarisations décrites dans la littérature, plusieurs sont applicables *in vivo*. C'est le cas de la polarisation induite par le para-hydrogène (PHIP), le pompage optique et la polarisation dynamique nucléaire (PDN).

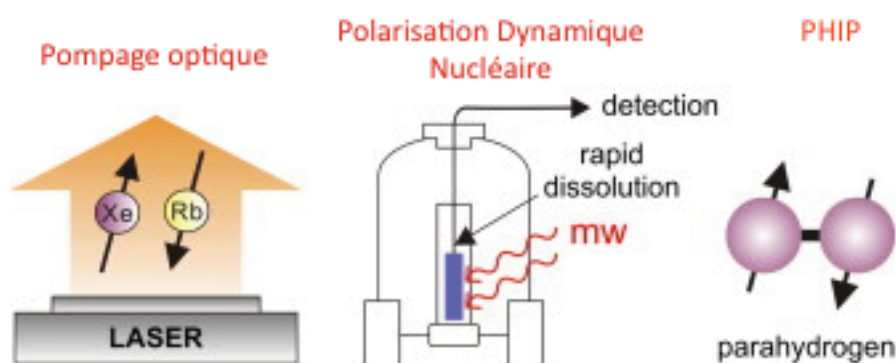


Figure 32. Techniques d'hyperpolarisation utilisées *in vivo*. Adapté de (Lee, Okuno, and Cavagnero 2014).

(i) Polarisation induite par le para-hydrogène (PHIP)

Un des autres moyens d'augmenter la polarisation est d'utiliser les propriétés des molécules d'hydrogènes en conformation para au travers de la **PHIP** (Figure 33).

Cette technique d'hyperpolarisation se déroule en 3 étapes : 1) production de para-hydrogène, 2) réaction d'hydrogénation sur un catalyseur et 3) le transfert de polarisation de l'hydrogène vers le noyau d'intérêt.

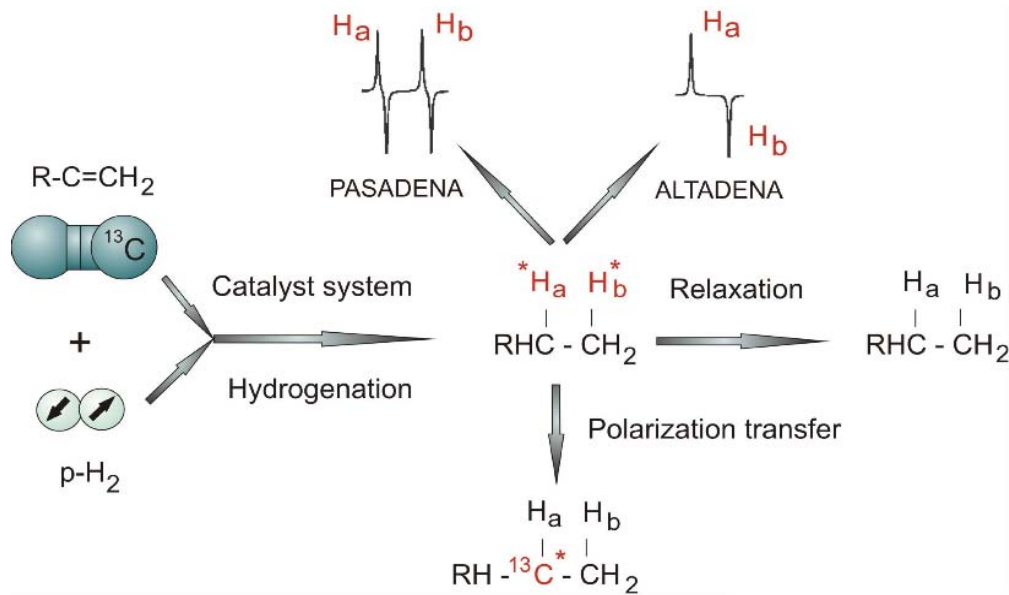


Figure 33. L'hyperpolarisation par PHIP.

L'apport de polarisation résultant de l'hydrogénation de la molécule peut être converti en polarisation nucléaire. Le transfert de polarisation peut ainsi se faire par deux techniques différentes : la **PASADENA** (Parahydrogen And Synthesis Allow Dramatically Enhanced Nuclear Alignment) ou l'**ALTADENA** (Adiabatic Longitudinal Transport After Dissociation Engenders Net Alignment) (Figure 34). La première se déroule à champ magnétique élevé alors que la seconde peut être réalisée à bas champ (Figure 35).

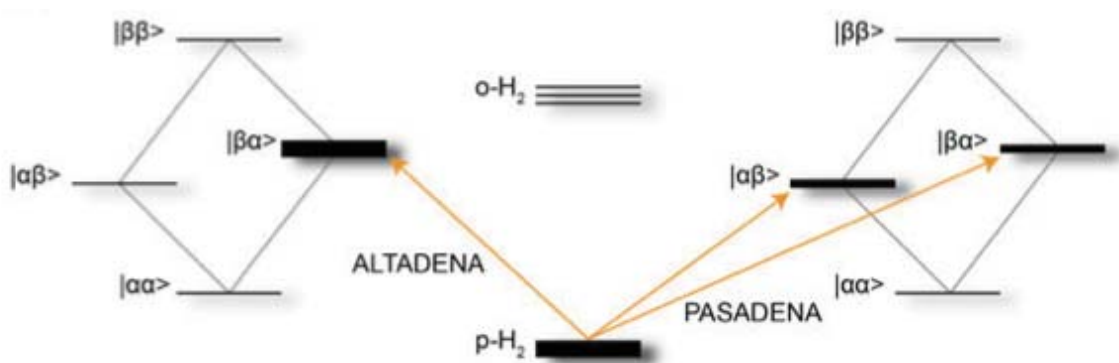


Figure 34. Diagrammes décrivant la conversion de la polarisation du parahydrogène vers la molécule à polariser. Deux méthodes sont possibles : l'ALTADENA et la PASADENA. L'ALTADENA conduit à l'augmentation de la population de spins du niveau $\alpha\beta$ ou $\beta\alpha$ alors que la PASADENA conduit à l'augmentation de la population de spins du niveau $\alpha\beta$ et $\beta\alpha$. D'après (Witte and Schröder 2013).

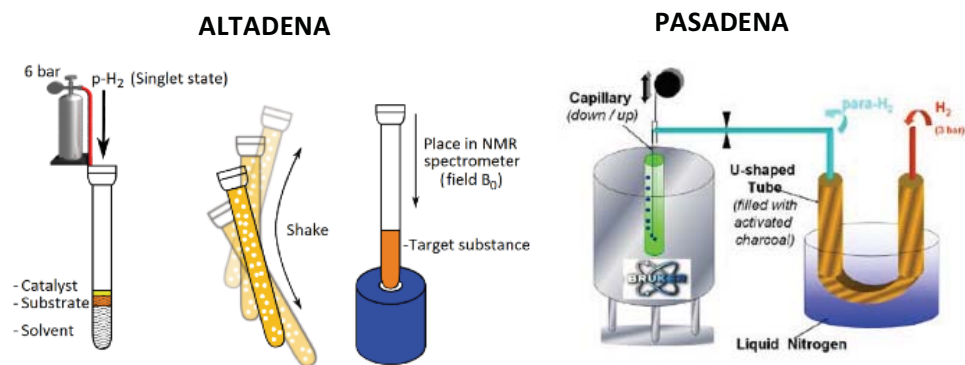


Figure 35. Hyperpolarisation par ALTADENA et PASADENA. L'hyperpolarisation par ALTADENA se déroule à température ambiante et champ magnétique faible alors que la PASADENA nécessite un champ magnétique élevé.

La PHIP permet de produire une polarisation supérieure à 20% en quelques secondes mais est limitée aux molécules contenant des doubles ou triples liaisons carbone-carbone. La polarisation obtenue par PHIP est très stable à température ambiante et peut perdurer des heures voire des jours.

La PHIP est particulièrement utilisée en chimie pour la caractérisation d'intermédiaire de synthèse, le suivi du catabolisme en encore la détermination de vitesses de réactions chimiques. En médecine, elle est appliquée au développement de nouveaux agents de contraste afin d'augmenter la sensibilité du diagnostique médical (Olsson et al. 2006; Shchepin et al. 2014; Truong et al. 2014).

Son utilité a également été montrée dans le suivi du métabolisme du cycle tricarboxylique (TCA) au travers de la polarisation par PHIP du [1-¹³C] diéthyl succinate (Bhattacharya et al. 2007; Zacharias et al. 2012).

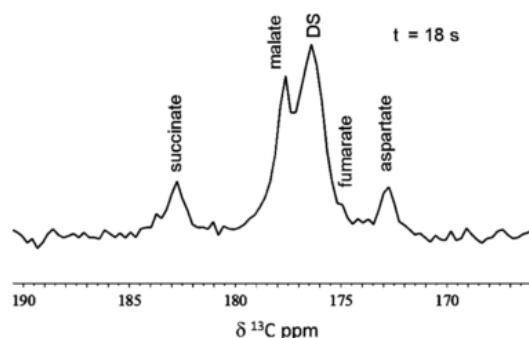


Figure 36. Visualisation des intermédiaires du cycle TCA *in vivo* après une injection de [1-¹³C] diéthyl succinate hyperpolarisé par PHIP (Zacharias et al. 2012). DS = [1-¹³C] diéthyl succinate. Expérience réalisée à 4,5T avec une FA de 30° et une acquisition à t=18s après injection.

On notera également l'existence d'une variante de la PHIP, la polarisation par **SABRE** (Signal Amplification by Reversible Exchange) qui utilise également le para-hydrogène pour polariser un substrat (Adams et al. 2009). Contrairement à la PHIP, la SABRE ne modifie pas la structure chimique du composé à étudier (Figure 37).

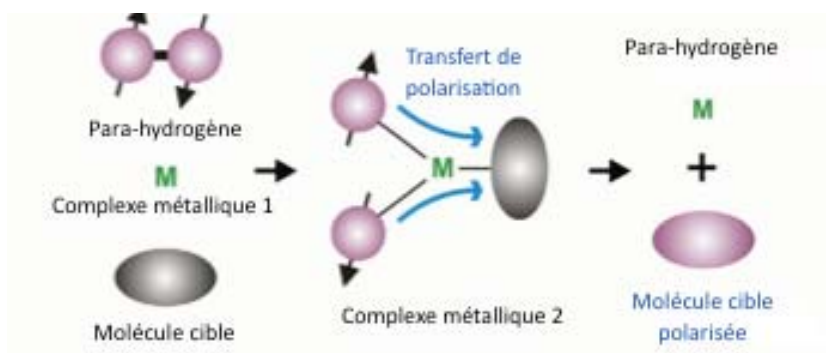


Figure 37. Hyperpolarisation PHIP SABRE. Contrairement aux autres techniques de polarisation par PHIP, l'hyperpolarisation SABRE ne comporte pas d'hydrogénation de la molécule cible. En gris : éléments avant polarisation, en rose : après polarisation, [M] : catalyseur. D'après (Lee et al. 2014).

(ii) Pompage optique

Le principe du pompage optique fut établi en 1950 par Alfred Kastler (Kastler 1950). Le développement de la technique du pompage optique qui permet de modifier l'état des atomes à l'aide d'une irradiation lumineuse lui a valu l'obtention du prix Nobel de physique en 1966.

La polarisation par pompage optique est couramment utilisée pour la polarisation de gaz nobles tels que l' ^3He ou le ^{129}Xe . La polarisation de ces gaz peut être obtenue par deux méthodes différentes : la plus largement utilisée étant la **POES** (pompage optique par échange de spin ou SEOP en anglais pour *Spin-Exchange Optical Pumping*) car cette technique de polarisation est beaucoup plus efficace que le **POEM** (pompage optique par échange de métastabilité ou en anglais MEOP pour *Metastability Exchange Optical Pumping*). La POES se déroule en deux étapes car elle utilise un intermédiaire de type métal alcalin comme le **rubidium**, pour la polarisation des gaz. Ainsi, dans un premier temps, l'électron de valence du rubidium sous forme vapeur est polarisé par une excitation laser (à 725nm) : c'est la **phase de pompage optique**. Puis, dans un second temps, cette polarisation est transférée aux gaz nobles, c'est l'**étape de collision**. Elle est utilisée pour la polarisation de tous les gaz nobles. La POEM quant à elle n'utilise pas d'intermédiaire de type métal alcalin pour la polarisation. Cette dernière est préférée pour la polarisation de l'hélium en raison de sa polarisation plus rapide.

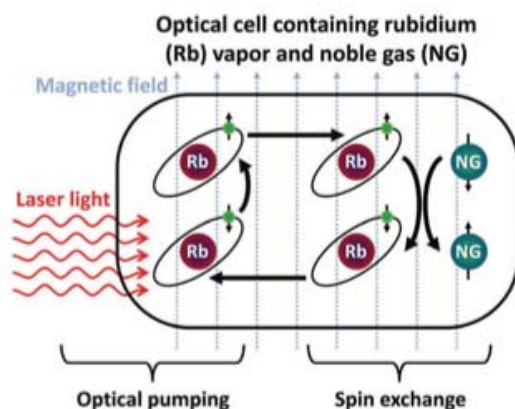


Figure 38. Principe de la polarisation par pompage optique par POES. (d'après Mugler and Altes 2013) `

Utilisée principalement pour des applications en imagerie médicale, l'inhalation d' ^3He et de ^{129}Xe hyperpolarisés ont montré leur utilité dans la mesure du volume pulmonaire tant chez l'animal (Fox et al. 2013) que chez l'Homme (Kaushik et al. 2011; Kirby et al. 2012). L'imagerie de diffusion des gaz hyperpolarisés permet également de visualiser les modifications des conduits aériens (Quirk et al. 2011).

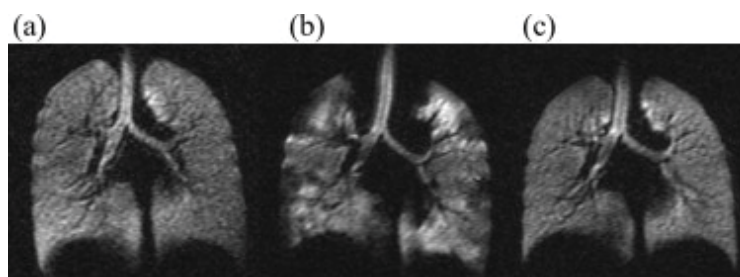


Figure 39. Visualisation de bronchoconstriction et de la bronchodilatation des poumons par IRM suite à l'inhalation de xénon hyperpolarisé. (a) Image des poumons sans administration de traitement, les voies pulmonaires et le parenchyme sont visualisés de manière homogène. (b) Images acquises après administration de méthacholine (bronchoconstricteur). L'hétérogénéité du signal révèle une diminution de la capacité ventilatoire. (c) Après traitement à l'albutérol, la ventilation retrouve une capacité proche de la capacité initiale. Extrait de (Liu et al. 2014) .

Le ^{129}Xe présentant l'avantage d'être soluble dans le sang, il permet ainsi le suivi des échanges gazeux pulmonaires. Ainsi, le ^{129}Xe pénétrant dans le système vasculaire pourra être délivré jusqu'au cerveau *via* la circulation sanguine permettant par exemple le suivi de l'évolution de la perfusion cérébrale dans le cerveau en ischémie (Zhou et al. 2011). A l'échelle cellulaire, le suivi de la fixation du ^{129}Xe à l'hémoglobine a permis de mettre en évidence son utilité dans la distinction des compartiments intra et extracellulaires (Bifone et al. 1996) et ainsi son rôle dans l'évaluation de la viabilité cellulaire (Boutin et al. 2011).

Plus récemment, des systèmes de porteurs de ^{129}Xe hyperpolarisé se sont développés comme le **cryptophane-111** (Dubost et al. 2013). En effet, le ^{129}Xe n'étant pas spécifique d'une cible biologique particulière, les efforts scientifiques se tournent vers un processus d'encapsulation du ^{129}Xe hyperpolarisé afin de le diriger vers des cibles biologiques comme les récepteurs cellulaires.

(iii) La Polarisation Dynamique Nucléaire (PDN)

La **PDN** est une technique d'hyperpolarisation qui consiste en la polarisation des spins nucléaires d'un échantillon à l'état solide afin d'augmenter le signal RMN.

La PDN fût décrite pour la première fois de façon théorique par **Albert Overhauser** en 1953 (Overhauser 1953). Dans ce modèle, Albert Overhauser propose que la saturation des électrons dans un métal conduit à la production d'une large polarisation des spins nucléaires du métal. Cette théorie fût démontrée quelques mois plus tard par les travaux de T Carver et C Slichter (Carver and Slichter 1953) puis étendue aux spins électroniques en solutions (Abragam 1955).

La PDN est générée artificiellement à l'état solide (1,4°K) en présence d'un champ magnétique de 3T en transférant la polarisation des spins d'électrons libres d'un radical porteur aux spins nucléaires de la molécule à polariser grâce à une irradiation micro-onde de l'échantillon à la fréquence de résonance des électrons (fréquence de Larmor) (Figure 40). Les mécanismes régissant la création d'un état hyperpolarisé sont connus comme étant l'**effet Overhauser**, l'**effet solide**, le **mélange thermique** et l'**effet croisé** (*Overhauser effect, solid effect, thermal mixing and cross effect*, en anglais) (Maly et al. 2008).

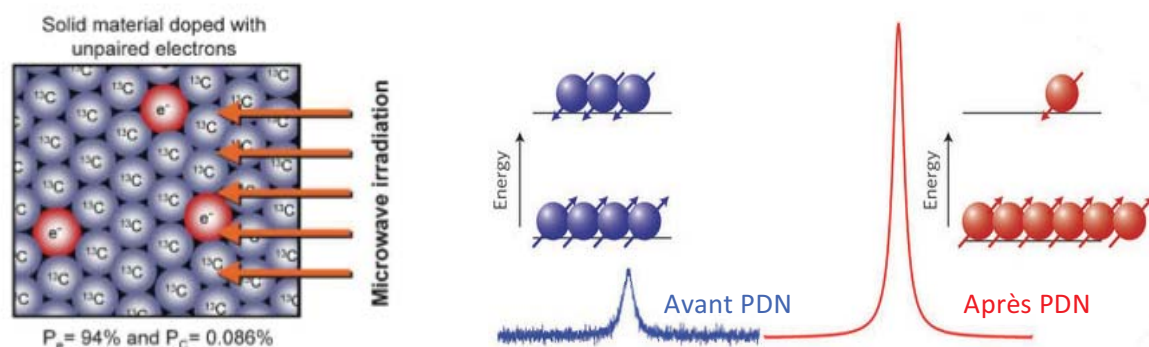


Figure 40. Principe de la PDN. *A gauche* : le transfert de polarisation des électrons (issus d'un radical porteur d'électrons libres) vers la molécule à polariser s'effectue à basse température (1,4°K) dans un champ magnétique de 3T grâce à l'irradiation micro-onde. *A droite* : représentation des changements de niveau énergétiques des spins nucléaires induits par la PDN conduisant à un signal plus intense en RMN.

La pièce centrale dans l'obtention d'un état hyperpolarisé est la source d'électrons paramagnétiques constituée par le **radical**. Les propriétés de résonance des spins électroniques (ou ESR pour *Electron Spin Resonance* en anglais) (largeur spectrale et relaxation des ESR) de ce dernier sont des paramètres essentiels dans la qualité de la PDN (Lumata et al. 2012; Lumata et al. 2013). En effet, plus un radical aura une bande ESR étroite, plus il sera efficace dans la génération d'un état polarisé. A l'heure actuelle, différents radicaux ont été développés pour la PDN (Figure 41) avec en chef de file le trityl radical OX063.

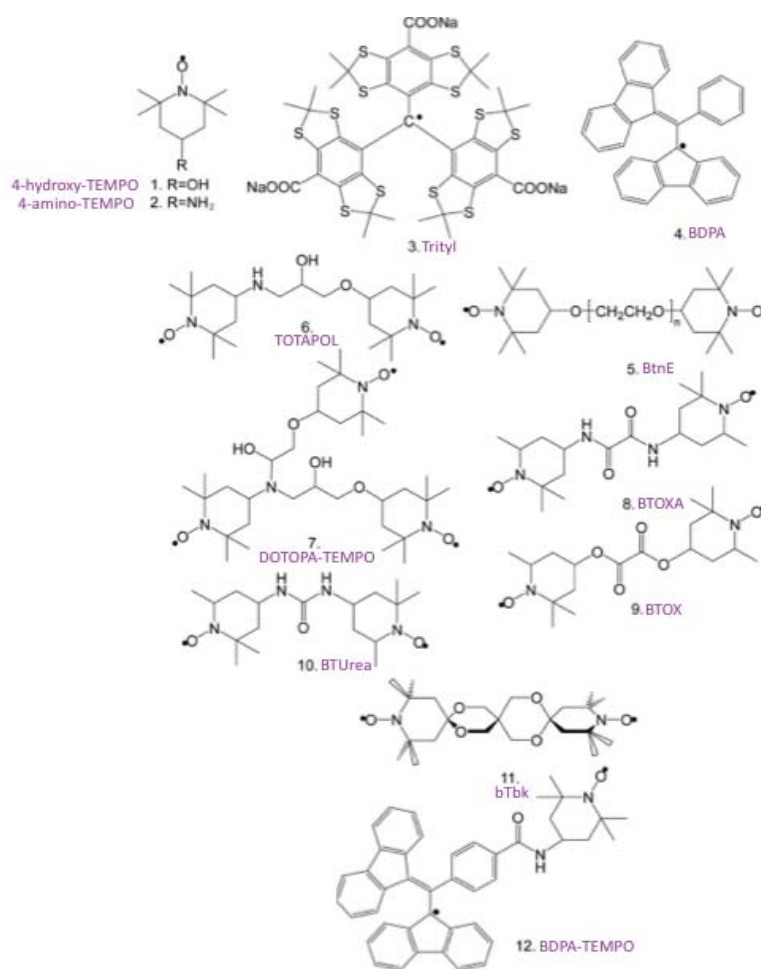


Figure 41. Les principaux radicaux utilisés pour la PDN. (Green et al. 2012)

La forte polarisation de ces radicaux à basse température et champ magnétique élevé est ensuite transmise à la molécule à polariser grâce à une irradiation micro-ondes à la fréquence de résonance des électrons. La polarisation par PDN est un processus long, avec au minimum 30 à 40 minutes de temps d'irradiation avant d'obtenir une polarisation proche du plateau maximal. Une fois le plateau

atteint, la polarisation à l'état solide peut être maintenue pendant plusieurs heures dans le polariseur.

Néanmoins, si la PDN est connue depuis le milieu des années 1950, son application *in vivo* ne vit le jour que dans les années 2000. En effet, jusqu'à cette date la principale limitation de l'application *in vivo* de la PDN était la diminution rapide du taux de polarisation après le passage à l'état liquide, diminution liée au temps de relaxation de la molécule marquée et polarisée (T_1 de l'ordre de la minute). Le développement **en 2003 du premier système de dissolution rapide** de l'échantillon polarisé par PDN par l'équipe suédoise de Jan Henrik Ardenkjaer Larsen (Ardenkjaer-Larsen et al. 2003) (Figure 42 et 42) a permis de franchir l'étape du passage aux études *in vivo* avec la même année une première détection du métabolisme du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé chez l'animal (K Golman 2003) (Figure 44).

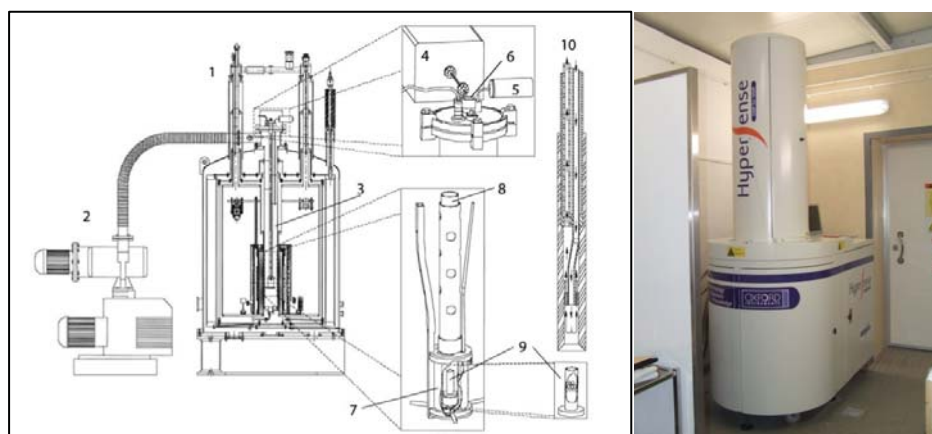


Figure 42. Le système de PDN suivi de dissolution. A gauche : description du premier concept de polariseur par d'après (Ardenkjaer-Larsen et al. 2003). 1, Polariseur PDN; 2, pompe à vide; 3, zone d'insertion à température variable; 4, source de micro-ondes; 5, indicateur de pression; 6, zone d'insertion de l'échantillon; 7, zone d'irradiation micro-ondes; 8, canne contenant l'échantillon; 9, coupelle contenant l'échantillon; 10, canne de dissolution. A droite : version commerciale de polariseur (HYPERSENSE®, Oxford Instrument).

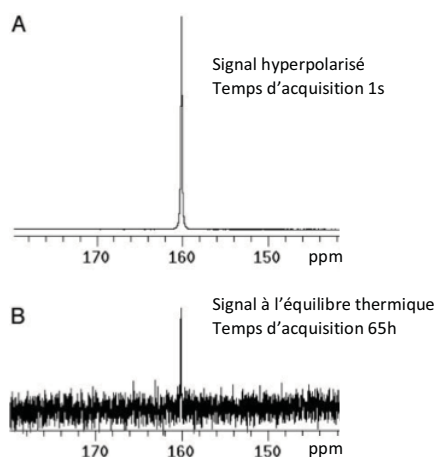


Figure 43. Apport de l'hyperpolarisation ^{13}C sur la qualité des spectres (d'après Ardenkjaer-Larsen et al., 2003). A) Spectre ^{13}C de l'urée à l'abondance naturelle après hyperpolarisation par PDN (concentration 59,6mM ; polarisation 20%). B) Spectre ^{13}C à l'équilibre thermique du même échantillon acquis à 9.4T à température ambiante, signal obtenu après 65h d'acquisition (angle d'impulsion 13,5° ; TR 1s).

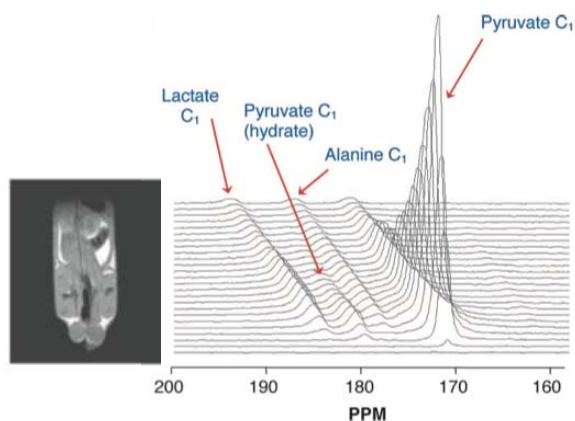


Figure 44. Hyperpolarisation par PDN puis dissolution pour la visualisation du métabolisme in-vivo (Golman 2003). A gauche : image anatomique du bas du corps du rat sur laquelle sera posée la coupe pour l'acquisition en ^{13}C . A droite : suite à l'injection intraveineuse de $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate (0,79mmol/kg), son métabolisme en pyruvate hydrate, alanine et lactate peut être observée. (TR 3s, angle d'impulsion 10°).

Ainsi par cette technique de PDN et de dissolution rapide, un **gain de signal de l'ordre de 10^4 à 10^5 fois** est obtenu, ce qui permet d'obtenir une acquisition de haute qualité, sans interférences, avec un temps d'échantillonnage réduit à quelques secondes (Ardenkjaer-Larsen et al. 2003) (Figure 43).

Le système de dissolution rapide de l'échantillon est essentiel pour le suivi *in vivo* du métabolisme. De la même manière, plusieurs équipes ont travaillé au développement de systèmes automatisés en sortie du polariseur afin de limiter les temps de transfert entre le polariseur et l'aimant (Cheng et al. 2013; Reynolds et al. 2014).

La préparation de l'échantillon à polariser est également une étape importante dans l'obtention d'une bonne polarisation en vue d'une application optimale.

Pour cela, le **radical devra être réparti de manière homogène** dans l'échantillon afin d'avoir une meilleure diffusion de la polarisation des spins électroniques vers les spins nucléaires dans l'ensemble de l'échantillon. Pour obtenir cette répartition dans un échantillon aqueux, du **glycérol**, du **glycol** ou du **TRIS** sont additionnés afin de prévenir la formation de cristaux lors du refroidissement de l'échantillon. Du **DMSO** peut également être ajouté à la préparation afin d'obtenir une dilution homogène de la molécule à polariser (Karlsson et al. 2012).

De plus, des **ions lanthanides** comme le gadolinium (Gd^{3+}) ou encore l'holmium (Ho^{3+}) peuvent être ajoutés à l'échantillon afin d'améliorer la polarisation à l'état solide (Friesen-Waldner et al. 2012; Gordon et al. 2012). Néanmoins, ces agents restent à ajouter avec précaution car ils induisent une diminution du T_1 de l'échantillon à l'état liquide. Ainsi pour chaque échantillon, une juste combinaison entre les quantités de radical et d'ions lanthanides devra être trouvée afin d'optimiser la polarisation à l'état solide (Figure 45).

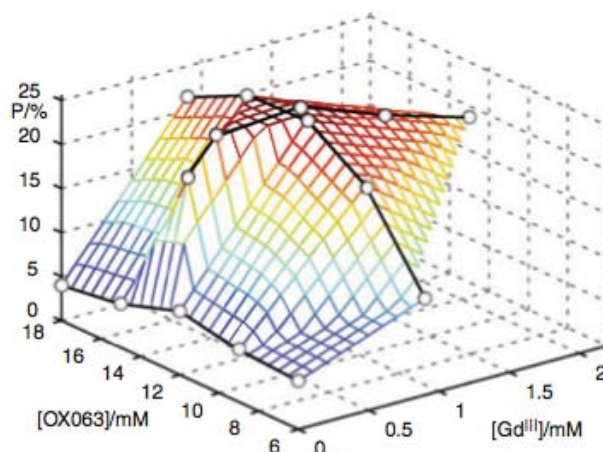


Figure 45. Optimisation de la polarisation du $[1-^{13}\text{C}]$ acétate en fonction des concentrations en radical (OX063) et en ions lanthanides (Gadolinium, Gd^{3+}) (Karlsson et al. 2012).

L'équipe Suisse de Geoffrey Bodenhausen et Sami Jannin propose un autre processus d'optimisation de la PDN : la polarisation croisée ou **cross polarisation**. Cette technique profite de la plus forte et plus rapide polarisation des protons pour transférer leur polarisation vers le ^{13}C voisin (Jannin et al. 2011; Bornet et al. 2012). Ainsi la **deutération** des échantillons et/ou du solvant permet d'augmenter les capacités de la cross polarisation pour l'optimisation de la PDN (Vuichoud et al. 2014).

Cette méthode de polarisation est donc une nouvelle technique prometteuse permettant une visualisation en temps réel des voies métaboliques *in vivo* à partir d'une molécule précurseur marquée au ^{13}C et hyperpolarisée. Si son principal inconvénient reste le temps de relaxation T1 relativement court à l'état liquide, le gain de signal obtenu reste très supérieur à la spectroscopie ^{13}C classique et en fait un bon outil pour le suivi des réactions métaboliques en temps réel. Le caractère temporaire et bref de cet état rend indispensable le développement de méthodes rapides de détection du signal.

c) Séquences de SRM et d'imagerie du métabolisme pour la PDN.

En effet, différentes stratégies ont été mises en place afin de préserver au maximum le signal de RMN généré par PDN tout en respectant des temps d'acquisition très courts.

Parmi celles-ci on trouve des séquences utilisant un **échantillonnage compressé** ou **compressed sensing** en anglais (Hu et al. 2008; Larson et al. 2011; Park et al. 2013). Cette méthode d'acquisition des données a pour but de reconstruire le signal à l'aide d'un minimum de mesures. Elle permet ainsi une accélération de l'encodage des images sans augmenter le temps acquisition mais en améliorant

sensiblement la résolution spatiale. Elle est utilisée pour l'acquisition des données CSI en hyperpolarisation.

Des stratégies de préservation du signal du produit polarisé injecté ont également été mises en place. Ce sont les séquences **SPSP** pour **Spectral-Spatial excitations** en anglais. Ce type de séquence permet le réglage spatial et spectral des impulsions afin d'exciter de manière moindre le précurseur hyperpolarisé injecté et d'exciter ses métabolites avec un angle d'impulsion plus élevé afin d'augmenter le rapport signal sur bruit (Larson et al. 2008; Lau et al. 2011; Schulte et al. 2013; Schmidt et al. 2014).

Un autre type de séquence est l'**IDEAL spiral CSI** (*Iterative Decomposition of water and fat with Least-square Estimation spiral Chemical Shift Imaging*) (Wiesinger et al. 2012). Dans ce design de séquence, chaque excitation est suivie par un module unique permettant l'encodage spatial et spectral grâce à une variation de temps d'écho entre chaque excitation. Cette nouvelle séquence permet une acquisition très rapide du signal à l'origine d'un gain en résolution temporelle et spatiale des cartes métaboliques.

Plus récemment, les derniers développements visent à optimiser la détection du signal en fonction du T_1 de chaque molécule polarisée en faisant varier les angles d'impulsion. Ce type de séquence a pour but de préserver le signal en début d'acquisition (angles d'impulsions faibles) et de récolter le maximum de signal en fin d'acquisition (angles d'impulsions élevés) en faisant varier les angles d'impulsion entre chaque impulsion et entre les métabolites (Xing et al. 2013).

3. Application de la PDN pour la visualisation du métabolisme in-vivo

De nombreuses molécules peuvent ainsi potentiellement être hyperpolarisées, cependant pour une étude du métabolisme in vivo, celles-ci doivent répondre à un certain nombre de critères tels que :

- Avoir une **solubilité** élevée et la capacité à se transformer en glace à l'état solide.
- Disposer d'un **temps de relaxation** (T_1) relativement **long** à l'état liquide.
- **Traverser rapidement la membrane plasmique des cellules.**
- Avoir un **métabolisme rapide** dont le(s) produit(s) de la réaction possède(nt) un **déplacement chimique assez grand** afin de pouvoir distinguer la molécule injectée des métabolites. De plus, la réaction ne doit pas entraîner la formation de produit potentiellement toxique.

Ces critères sont une première restriction dans le choix d'une molécule à hyperpolariser dans le cadre du suivi du métabolisme *in vivo* en ^{13}C -SRM (Brindle et al. 2011).

a) Le pyruvate hyperpolarisé

(1) Précurseur de choix

Le $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate constitue un métabolite de choix dans les études d'hyperpolarisation. En effet, c'est un intermédiaire commun à plusieurs voies métaboliques et cataboliques majeures dans les cellules (Figure 46).

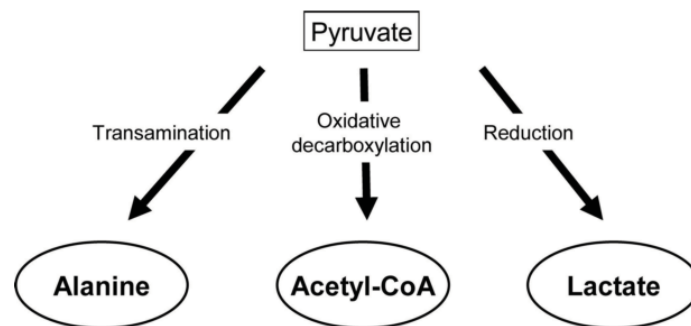


Figure 46. Voies impliquées dans le métabolisme du glutamate (Golman et al. 2006).

Suite à une injection intraveineuse de pyruvate, celui-ci est rapidement et complètement métabolisé. En fonction du statut énergétique des cellules du tissu étudié, le pyruvate pourra être converti à différents degrés en alanine, lactate via respectivement l'action de l'alanine aminotransférase et de la lactate deshydrogénase et/ou encore en CO_2 lors de la réaction de synthèse de l'acétyl-co-A (Golman et al. 2006). Outre sa métabolisation rapide, le pyruvate répond aux critères éligibles pour la polarisation et un suivi *in-vivo* en SRM (T_1 long de 60s *in-vitro* et 25s *in-vivo*).

(2) Les études de PDN sur le métabolisme du pyruvate in-vivo

La transformation du [1-¹³C] pyruvate hyperpolarisé est le métabolisme le plus largement étudié par PDN. Le suivi de sa métabolisation a été réalisé dans de nombreux organes, en condition normale et/ou en condition pathologique associée ou non à une thérapie.

On retrouve notamment l'étude du métabolisme du [1-¹³C] pyruvate au niveau **hépatique** (Spielman et al., 2009 ; Hu et al., 2009), **cardiaque** (Merritt et al. 2007; Schroeder et al. 2009; Schroeder et al. 2010; Schroeder et al. 2011; Josan et al. 2013), **rénal** (Kohler et al. 2007; Xu et al. 2011), **prostatique** (Lupo et al. 2010), **in vitro** (Gallagher et al. 2008; Keshari et al. 2013) et **in vivo** dans des **tumeurs** (Day et al. 2010; Larson et al. 2010; Chaumeil et al. 2012; Park et al. 2011b; Park et al. 2013).

Le [1-¹³C] pyruvate est utilisé pour la première fois dans l'étude du métabolisme cérébral en 2010. Ce sont les travaux de Hurd et de Marjanska qui ont montré en premier qu'à partir d'une injection périphérique de [1-¹³C] pyruvate hyperpolarisé, le signal du pyruvate est non seulement détectable dans le cerveau mais que de plus, ses métabolites (lactate et pyruvate hydrate) sont visibles (Hurd et al. 2010; Marjańska et al. 2010).

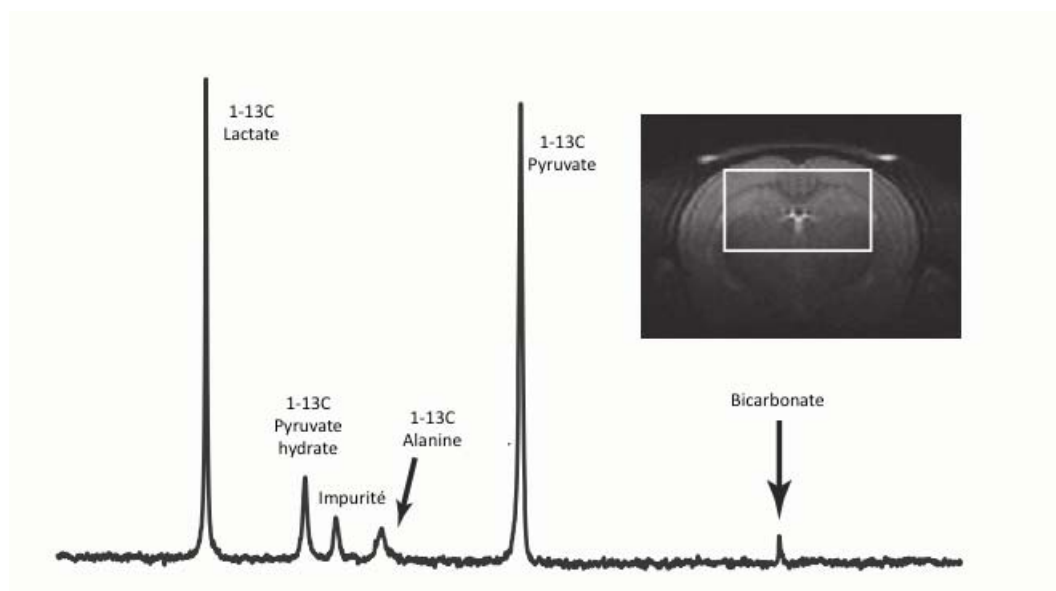


Figure 47. Premiers résultats de PDN obtenus dans le cerveau (Marjanska et al. 2010). Suite à l'injection périphérique de [1-¹³C] pyruvate hyperpolarisé, sa visualisation et son métabolisme peuvent être observés dans le cerveau.

La visualisation du pyruvate au sein du cerveau constitue une grande avancée dans l'étude du métabolisme cérébral en ¹³C SRM. En effet, à la suite de ces premiers travaux, une étude réalisée sur

la réponse des tumeurs gliales à la radiothérapie a permis de déterminer de nouveaux marqueurs permettant d'évaluer l'efficacité du traitement (Day et al. 2010; Park et al. 2011a).

(3) Le premier essai clinique

Suite au développement de la PDN pour le suivi du métabolisme chez l'animal, le futur de la PDN vise à introduire cette technique pour l'étude du métabolisme chez l'Homme. En effet, les informations apportées par la PDN ont montré leur étendue notamment pour le diagnostique tumoral et l'évaluation de l'efficacité des stratégies thérapeutiques.

Cependant, le passage de la PDN du laboratoire à la recherche clinique requiert l'optimisation du système de polarisation afin de pouvoir fournir de plus gros volumes de produits polarisés, exempt de toute contamination biologique et/ou chimique. C'est à nouveau le groupe de Jan Henrik Ardenkjær-Larsen qui mit au point le premier polariseur stérile utilisable pour la recherche clinique. Ce nouveau polariseur est doté d'un système unique où 4 échantillons peuvent être polarisés en même temps afin d'augmenter le rendement nécessaire pour une utilisation en clinique. Chaque échantillon est préparé de manière stérile et une fois introduit dans le polariseur va suivre un circuit stérile jusqu'au processus de dissolution. Le système de dissolution est également adapté afin de pouvoir produire des volumes de solution allant jusqu'à 60ml. En sortie du polariseur, le radical comportant les électrons libres est filtré afin de permettre l'injection du produit polarisé au patient. De plus, ce système dispose d'une technologie permettant de réduire la consommation d'hélium. On retrouve désormais ce polariseur commercialisé sous le nom de **SPINLab™** (Figure 48).



Figure 48. Photo du polariseur SPINlab™ développé par General Electric et utilisé pour les applications cliniques chez l'Homme de la PDN.

Le premier prototype a été installé à l'Université de Californie à San Francisco (UCSF) où il fut utilisé pour la première (et la seule à ce jour) étude sur l'Homme, sur des patients présentant un cancer de la prostate (Nelson et al. 2013). Les résultats sont présentés en Figure 49.

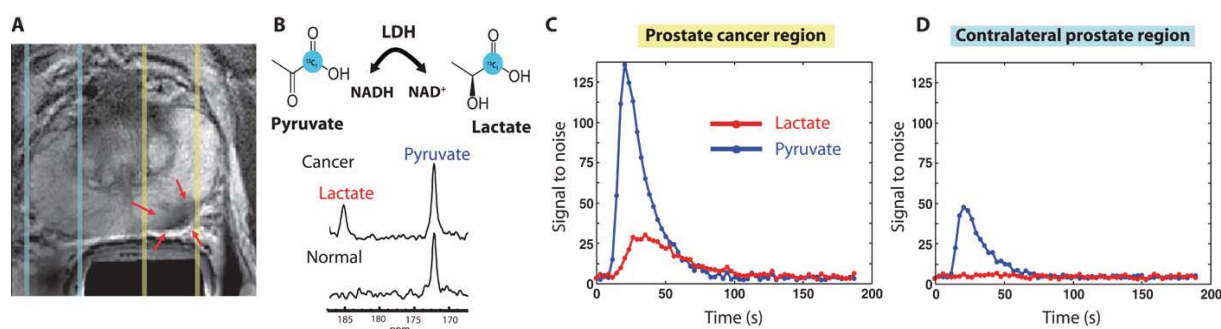


Figure 49. Résultats obtenus pour la première étude de PDN réalisée chez l'Homme. **A)** Imagerie T₂ de la prostate d'un patient présentant un cancer (repéré en imagerie par les flèches rouges). La position des coupes pour l'acquisition ¹³C est représentée en bleu pour la coupe passant par le tissu sain et en jaune pour celle contenant la tumeur. **B)** En haut, réaction de métabolisation du [1-¹³C] pyruvate en [1-¹³C] lactate. En bas, signal obtenu sur l'injection de [1-¹³C] pyruvate hyperpolarisé. On voit la présence du pic de lactate uniquement pour la coupe passant par la tumeur. **C)** et **D)** Evolution du signal dans la région de la prostate présentant la tumeur ou dans la partie saine.

Cette étude pionnière a montré la faisabilité de la PDN chez l'Homme et étend ainsi les capacités de diagnostique en RMN.

b) Les autres précurseurs hyperpolarisés par PDN

Depuis l'émergence de la PDN couplée à la dissolution, de nombreuses molécules ont été hyperpolarisées par PDN et suivies en SRM. Les précurseurs hyperpolarisés sont notamment des intermédiaires du cycle TCA. On citera en particulier l'hyperpolarisation du **pyruvate**, du **fumarate** et de l' **α -cétoglutarate** (AKG). D'autres voies métaboliques suscitent l'intérêt des chercheurs notamment pour l'étude du statut tumoral comme le **kéto-isocaproate** (KIC), la **glutamine** et le **glutamate**. Dernièrement, l'hyperpolarisation par PDN du **glucose** ouvre une nouvelle voie pour l'étude du statut énergétique des cellules. Ces précurseurs hyperpolarisés sont référencés dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Principaux précurseurs hyperpolarisés par DNP et détectés in vivo

	Taux de polarisation	Métabolisme suivi / enzyme	Références
[1- ¹³ C] pyruvate	25-30%	Glycolyse LDH/PDH	(Golman et al. 2006; Day et al. 2007; Chen et al. 2007; Albers et al. 2008; Hurd et al. 2010; Hu et al. 2012; Butt et al. 2014)
[2- ¹³ C] pyruvate	25-30%	Cycle TCA LDH/PDH	(Hu et al. 2012; Barb et al. 2013; Mishkovsky, Comment, and Gruetter 2012; Hurd et al. 2012; Marjańska et al. 2010)
[1- ¹³ C] éthyl pyruvate	25-28%	Métabolisme cérébral	(Hurd et al. 2010)
[1- ¹³ C] lactate	6-7%	LDH	(Chen et al. 2008)
¹³ C bicarbonate	12-15%	pH Adenyle cyclase	(Gallagher et al. 2008)
[5- ¹³ C] glutamine	5-34%	Glutaminase	(Gallagher et al. 2008; Cabella et al. 2013)
[1- ¹³ C] glutamate	28%	GDH	(Gallagher et al. 2011)
[1,4- ¹³ C ₂] fumarate	15-20%	Nécrose Furamase	(Karlsson et al. 2009; Clatworthy et al. 2012; Mignon et al. 2014)
[1- ¹³ C] deshydroxy ascorbate	10%	Synthèse vitamine C	(Bohndiek et al. 2011; Keshari et al. 2013)
[1- ¹³ C] AKG	16-19%	IDH/GDH	(Chaumeil et al. 2014; Chaumeil et al. 2013a)
[1- ¹³ C] KIC	15%	BCAT	(Butt et al. 2012; Josan et al. 2012; Billingsley et al. 2014)
[U-2H, U-13C] glucose	15%	Glycolyse	(Rodrigues et al. 2014)

4. A la recherche de nouveaux précurseurs d'intérêt en RMN pour la visualisation du métabolisme cérébral dans la maladie de Parkinson.

a) Métabolites d'intérêts

Ainsi de nombreux précurseurs peuvent être hyperpolarisés par PDN et suivis en RMN. Dans notre étude, comme vu précédemment, la dénervation dopaminergique entraîne une modification du métabolisme glutamatergique dans le striatum chez des animaux modèles de la maladie de Parkinson. Ces changements sont associés à des modifications de l'interaction neurone-glie au niveau des synapses glutamatergiques impliquant potentiellement le cycle glutamate-glutamine. Donc l'étude de ces modifications par PDN requiert le choix d'un précurseur permettant d'apprécier de façon dynamique l'activité du cycle glutamate-glutamine *in vivo*. Il doit également répondre aux critères de choix liés à la technique d'hyperpolarisation par PDN.

La majeure limitation à l'utilisation de la PDN est la perte rapide de la polarisation. En effet, à l'arrêt de l'irradiation micro-ondes, la polarisation va rapidement tendre à retrouver son état d'équilibre. Il faut donc prendre en compte l'environnement atomique du ^{13}C de la molécule à polariser. On préférera donc cibler une molécule dont le carbone marqué au ^{13}C sera situé dans un groupement carboxyl (COOH) dont le T_1 est de l'ordre de 20 à 40s (pour les autres carbones le T_1 serait plus court) (Gallagher et al., 2008).

Face à ces impératifs, 4 molécules ont donc retenu notre attention : le pyruvate, l'AKG, la glutamine et le glutamate (Figure 50).

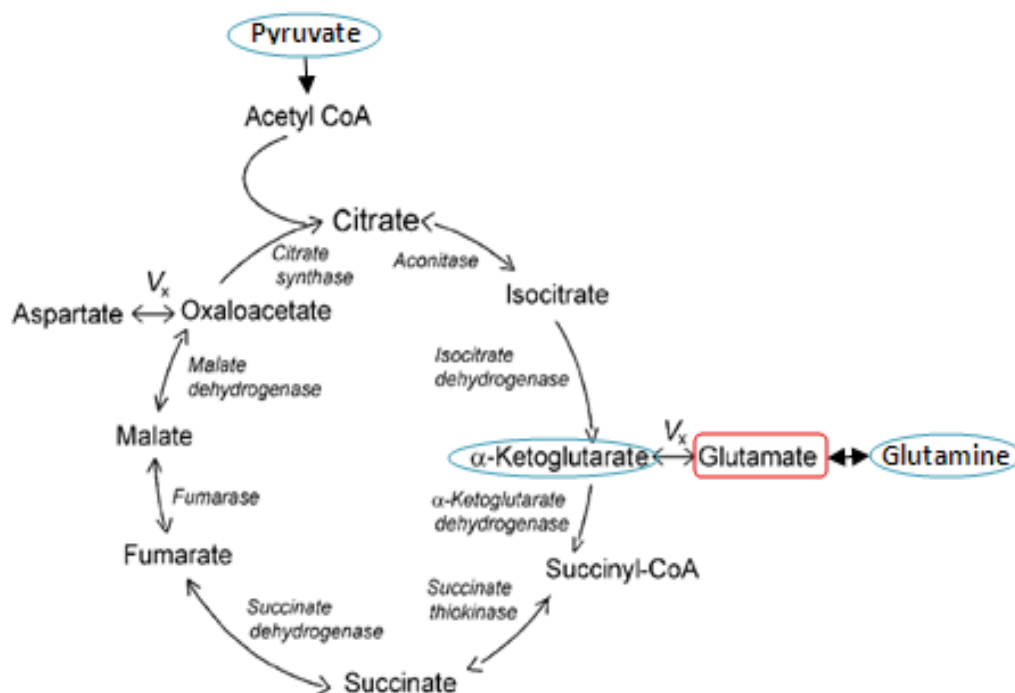


Figure 50. Représentation du cycle TCA et des potentiels précurseurs pouvant être hyperpolarisés par afin de suivre *in vivo* de façon dynamique le cycle glutamate-glutamine.

(1) Le pyruvate

Si la polarisation du [1-¹³C] pyruvate est bien connue, son marquage en C1 est perdue avant son entrée dans le cycle TCA rendant impossible la visualisation du glutamate *via* ce précurseur. Cependant son marquage en position C2, entre dans le cycle TCA et pourrait permettre potentiellement à son marquage de venir intégrer le glutamate et la glutamine en position C1.

Cette possibilité a été démontrée pour la première fois dans une étude réalisée *ex vivo* à très haut champ (11,7T) sur un cœur perfusé (Schroeder et al. 2009). L'étude menée par la suite sur le cerveau n'a pas montré la possibilité de visualiser la synthèse de glutamate à partir de [2-¹³C] pyruvate hyperpolarisé (Marjańska et al. 2010). Cependant, plus récemment, l'optimisation des gradients sur un aimant 3T couplée à une nouvelle stratégie d'acquisition des données (séquence à angle d'impulsion variable) a permis la visualisation du glutamate dans le cerveau à partir de [2-¹³C] pyruvate hyperpolarisé (Park et al. 2013).

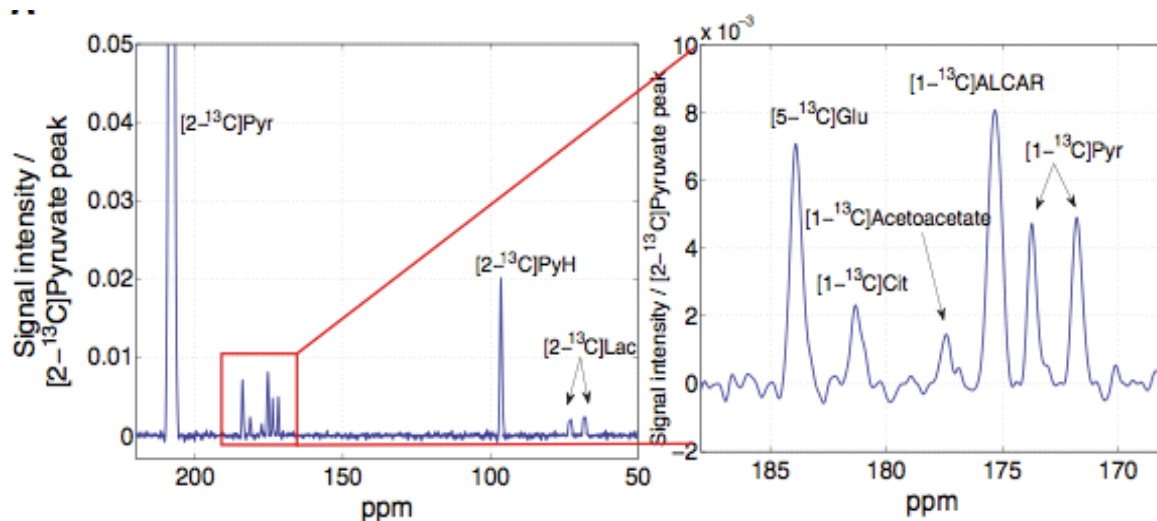


Figure 51. Spectre ^{13}C obtenus dans le cerveau du rat après injection de $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé (Park et al. 2013).

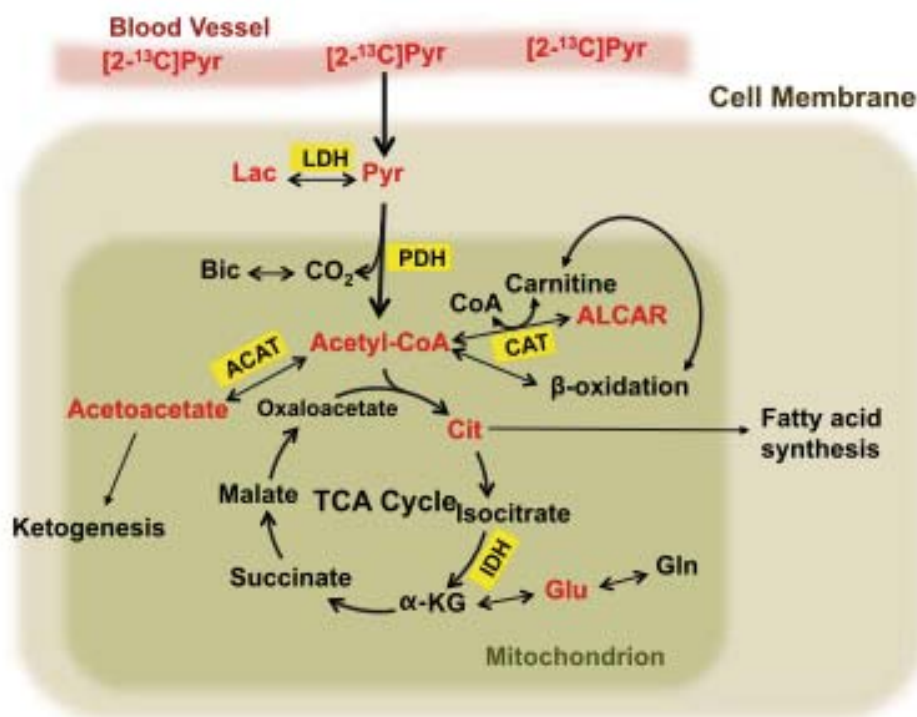


Figure 52. Représentation des métabolites du cycle TCA visibles dans le cerveau du rat après injection de $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate

Ainsi, s'il est possible de suivre l'apparition du glutamate dans le cerveau après injection de $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé, cette méthode requiert un système optimisé pour la détection du signal. De plus, le $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé semble un précurseur trop en amont dans le cycle TCA pour pouvoir détecter de façon optimale le cycle glutamate-glutamine *in vivo* à 3T (Figure 50) (Schroeder et al. 2009).

(2) L'AKG

Intermédiaire du cycle TCA, l'AKG est un précurseur direct de la synthèse de glutamate au niveau neuronal (Figure 50 et Figure 53).

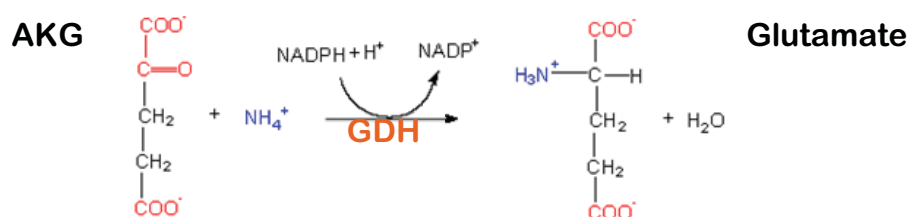


Figure 53. Synthèse de l'AKG en glutamate *via* la glutamate deshydrogénase (GDH)

L'hyperpolarisation du [1-¹³C] AKG est décrite pour la première fois par Myriam Chaumeil en 2013 dans un travail réalisé sur les animaux porteurs de tumeurs cérébrales de type gliomes (Chaumeil et al. 2013a). Dans cette étude, un taux de polarisation de 17% est obtenu après 1h de polarisation par PDN avec un T₁ de 52±4s. L'injection systémique conduit à l'apparition de son produit hydraté ([1-¹³C] α ceto-glutarate hydrate) et de [1-¹³C] 2-hydroxyglutarate dans le cerveau d'animaux porteur d'un gliome ayant une mutation du gène de l'isocitrate deshydrogénase (IDH). Ce dernier métabolite n'est pas retrouvé chez les animaux non porteurs de la mutation permettant ainsi de discriminer le statut de la tumeur cérébrale. Le travail récent de la même équipe complète cette étude (Chaumeil et al. 2014). Les auteurs montrent pour la première fois que le [1-¹³C] glutamate peut être visualisé *in vivo* suite à l'injection systémique de [1-¹³C] AKG (Figure 54).

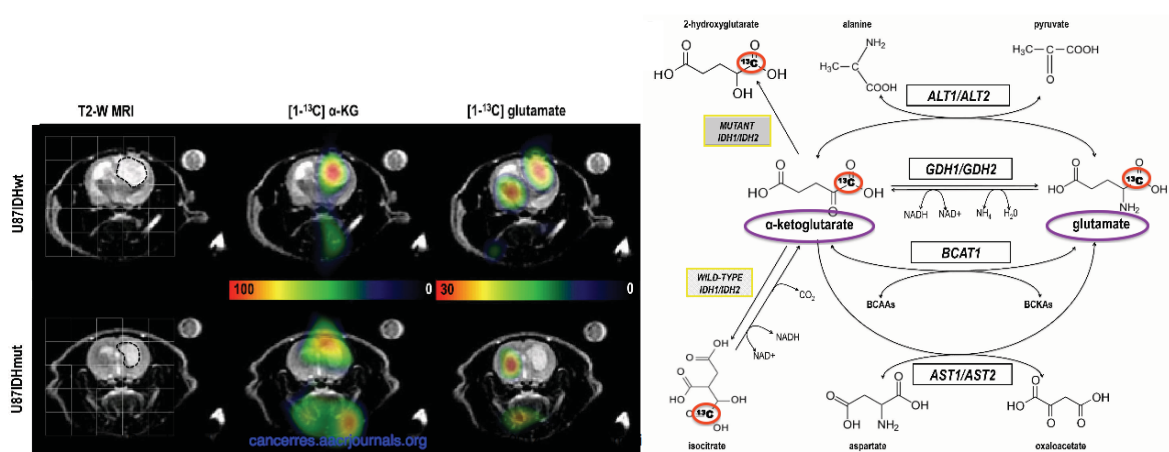


Figure 54. Hyperpolarisation du [1-¹³C] AKG et visualisation de son métabolisme *in vivo*. *A gauche* : dans cette étude, des rats porteurs de gliomes ayant une mutation ou non du gène de l'isocitrate deshydrogénase (mutation U87IDH). Expérience réalisée à 3T avec un FA de 25°, une image acquise toutes le 5s avec une résolution de 5x5mm². *A droite* : représentation des voies métaboliques impliquées. La mutation U87IDH est associée à une baisse de la conversion de l'AKG en glutamate (Chaumeil et al. 2014).

Cependant, dans cette étude, même à haut champ (11,7T) et *in vitro*, le métabolisme de la glutamine n'est pas visible. En effet, l'injection du [1-¹³C] AKG hyperpolarisé n'entraîne qu'une faible synthèse de [1-¹³C] glutamate hyperpolarisé. La glutamine nécessitant une autre étape de synthèse il est possible que son signal soit en deçà des seuils de détection.

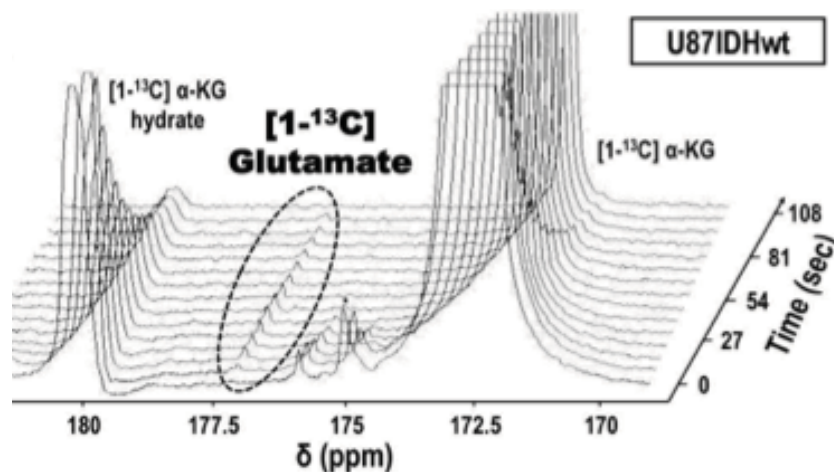


Figure 55. Représentation empilée des spectres acquis *in vitro* dans une culture cellulaire de cellules tumorales non mutées pour le gène IDH1 (U87IDHwt). Spectres acquis à 11,7T, FA 13°, TR 3s (Chaumeil et al. 2014).

Ainsi, au vue de ces résultats, nous avons décidé de se focaliser directement sur le glutamate ou la glutamine elle même afin de suivre leur métabolisme.

(3) La glutamine

La glutamine est hyperpolarisée par PDN pour la première fois en 2008 dans le travail de Ferdia Gallagher réalisé sur des cellules issues de tumeurs hépatiques (Gallagher et al. 2008). Dans cette étude, une polarisation de la $[5-^{13}\text{C}]$ glutamine de l'ordre de 5% est obtenue après 2h de polarisation. Son temps de relaxation est également très court avec un T_1 estimé à 16,1s. Ferdia Gallagher et ses collaborateurs étudient le métabolisme de la glutamine *in vitro* dans des cellules hépatiques saines ou tumorales. En effet, les hépatocytes sont des cellules riche en glutaminase et il est intéressant d'étudier ce métabolisme dans le cadre de tissus tumoraux, le métabolisme de la glutamine étant influencé notamment par les oncogènes. Ainsi cette étude montre pour la première fois la visualisation de la synthèse de glutamate à partir de $[5-^{13}\text{C}]$ glutamine hyperpolarisée par PDN (synthèse exacerbée dans le modèle de tumeur hépatique (HepG2) comparé aux cellules hépatiques saines). Par la suite la détection du métabolisme de la glutamine en glutamate fût montrée *in vivo* toujours dans un modèle de tumeur hépatique (Cabella et al. 2013) (Figure 56).

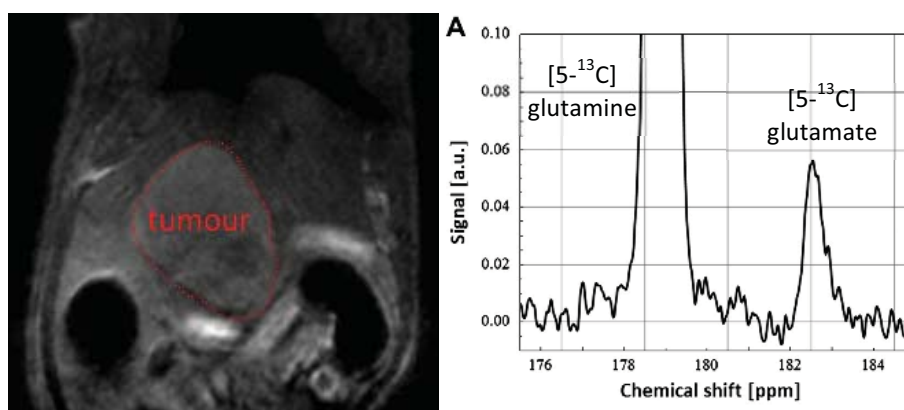


Figure 56. Métabolisme de la $[5-^{13}\text{C}]$ glutamine hyperpolarisée par PDN *in vivo*, chez le rat, dans une modèle de tumeur hépatique. A gauche: image anatomique T_2 de la tumeur hépatique. A droite: spectre de la $[5-^{13}\text{C}]$ glutamine hyperpolarisée (178,8ppm) et de son métabolite le $[5-^{13}\text{C}]$ glutamate (182,3ppm) obtenu à 3T avec une antenne de surface (FA 10°, spectre acquis 20s après l'injection de glutamine hyperpolarisée).

Cependant, dans ce travail, les auteurs montrent les difficultés d'utilisation de la glutamine hyperpolarisée d'une part par son processus de polarisation très long (de 2h pour l'étude de F. Gallagher en 2008 à 5h dans ce travail) pour un temps de relaxation court (de l'ordre d'une vingtaine de secondes) et d'autre part pour la production non désirée d'intermédiaire comme le

pyroglutamate (forme cyclisée du glutamate ayant un déplacement chimique très proche de celui du glutamate) pouvant gêner la visualisation du glutamate.

Face à ces difficultés de polarisation et son T_1 très court, nous nous sommes finalement orientés vers la polarisation du glutamate lui-même.

(4) Le glutamate

En effet, le glutamate présente l'avantage d'être facilement polarisable, avec un taux de polarisation atteignant 28%, et d'avoir un T_1 relativement long (T_1 $33,9 \pm 7s$) permettant sa détection *in vivo* (Gallagher et al. 2011). Étudié dans les tumeurs hépatocytaires, l'injection de $[1-^{13}C]$ glutamate hyperpolarisé conduit à la visualisation de l'AKG dans ces cellules. Si à l'heure actuelle, la polarisation du glutamate n'a pas été reproduite pour des études *in vivo*, ces capacités de polarisation en font un bon candidat pour le suivi de son métabolisme en glutamine *in vivo*.

Dans le cadre d'une étude du métabolisme cérébral, un critère supplémentaire, et non des moindres, est à prendre en compte. C'est la capacité d'une molécule à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE).

b) Challenge du passage de la BHE

(1) Découverte de la BHE

La découverte de la BHE remonte à la fin du 19^{ème} siècle grâce aux travaux de Paul Erlich. Dans cette expérience, il injecta un colorant hydrosoluble dans le sang et constata que celui-ci marque tous les organes sauf le système nerveux central. Sa conclusion de l'époque fût que cette absence de coloration venait du fait que le cerveau « ne prenait pas » la coloration. La notion de BHE n'émergea réellement que quelques années plus tard suite aux travaux de Goldmann en 1913. En effet, il montra qu'après une injection de bleu Trypan dans le liquide cérébro-spinal seul le cerveau prenait la coloration. Il existe donc une barrière imperméable aux colorants séparant le système nerveux central du reste de l'organisme.

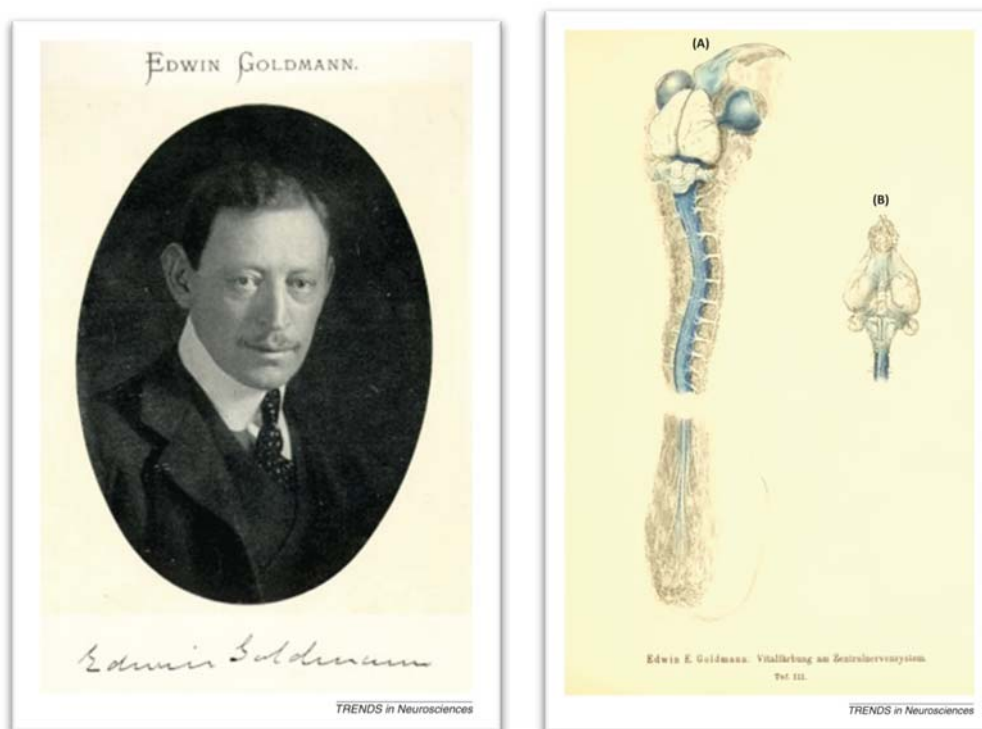


Figure 57. Edwen Ellen Goldmann et la découverte de la barrière hémato-encéphalique. A gauche : portrait Edwen Ellen Goldmann (1862-1913). A droite: Illustration de la découverte de la barrière hémato-encéphalique par Goldmann. Le système nerveux central d'un jeune lapin est représenté en vue dorsale (A) et ventrale (B). La coloration au bleu trypan de tout le système nerveux central sauf au niveau du parenchyme cérébral suggère une absence de pénétration de la coloration dans le cerveau dû à la présence d'une barrière imperméable : la barrière hémato-encéphalique (d'après Bentivoglio and Kristensson 2014).

(2) Structure de La BHE

La BHE est une membrane semi-perméable formée par une couche de cellules endothéliales qui tapisse capillaires cérébraux. Ces cellules endothéliales sont associées par des jonctions serrées créant ainsi une barrière infranchissable pour de nombreuses molécules. Classiquement, les molécules possédant un poids moléculaire élevé et/ou peu lipophile et/ou chargées électriquement ne peuvent pas pénétrer dans le système nerveux central. Seules certaines molécules pourront la traverser. C'est le cas des molécules très lipophiles qui peuvent passer *via* un transport facilité. D'autres molécules telles que le glucose et les acides aminés pourront franchir la barrière *via* des transporteurs spécifiques (Abbott et al 2006) (Figure 58).

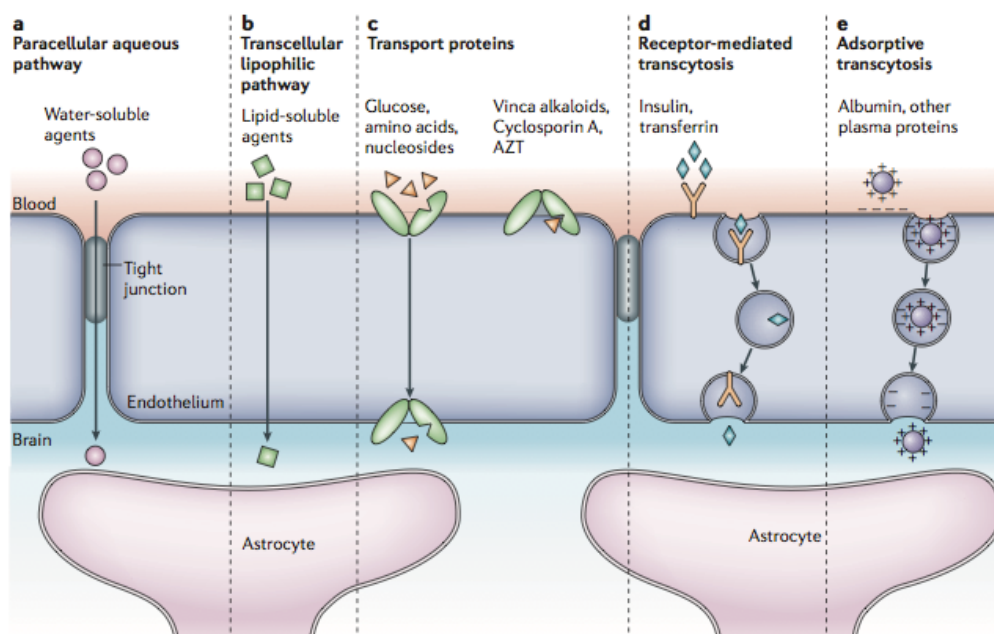


Figure 58. Structure de la BHE (Abbott et al. 2006).

(3) RÔLE de la BHE

La BHE constitue une barrière imperméable à de nombreuses molécules. Ainsi la BHE va avoir un rôle de protection du cerveau contre les substances sanguines provenant du reste de l'organisme et pouvant endommager les cellules cérébrales. Cette barrière va également permettre le maintien d'un environnement constant en protégeant le système nerveux central des variations importantes des concentrations en ions, en neuro-transmetteurs et en neuro-hormones.

Pour l'étude du métabolisme cérébral en SRM du ^{13}C hyperpolarisé il faudra que la molécule hyperpolarisée passe rapidement la BHE soit de part ces propriétés lipophiles soit de part la présence d'un transporteur efficace ou encore par induction de l'ouverture de cette barrière.

(4) PDN, BHE et métabolisme

La BHE présente une des principales limitations à l'utilisation de la PDN pour la visualisation du métabolisme cérébral en SRM. En effet, la molécule polarisée devra pouvoir passer rapidement la BHE, dans la fenêtre de temps permise par son T_1 afin de lui permettre d'atteindre le cerveau et d'y être métabolisée dans les neurones ou les cellules gliales.

Les molécules hyperpolarisées par PDN et étudiées à ce jour *in vivo* dans le cerveau sont : le [1-¹³C] pyruvate et l'éthyl pyruvate (Hurd et al. 2010), le [1-¹³C] KIC (Butt et al. 2012) et le [1-¹³C] AKG (Chaumeil et al. 2013b; Chaumeil et al. 2014).

Si l'on prend l'exemple du [1-¹³C] pyruvate, molécule possédant un transporteur à la BHE (Halestrap and Price 1999), même à la dose maximale injectable (80mM), seul 1mM se retrouve dans le cerveau (Hurd et al. 2010). C'est pourquoi, dès les premiers essais de détection du pyruvate dans le cerveau, les chercheurs ont tenté de cibler des molécules passant plus facilement la BHE. C'est le cas par exemple de l'éthyl pyruvate (Hurd et al. 2010).

Pour l'étude du métabolisme par PDN, il faudra donc choisir un métabolite capable de passer facilement la BHE. Une autre stratégie consiste à induire une rupture temporaire de la barrière hémato-encéphalique.

Pour cela différentes techniques existent :

- **L'injection d'une solution hyperosmolaire de mannitol ou d'arabinose.** La solution hyperosmolaire va entraîner, au contact des cellules endothéliales de la BHE, une rupture des jonctions serrées permettant ainsi une ouverture temporaire de la BHE sur une durée moyenne de 10min. Cette technique est la plus largement décrite dans la littérature, pour revue voir (Rapoport 2000).

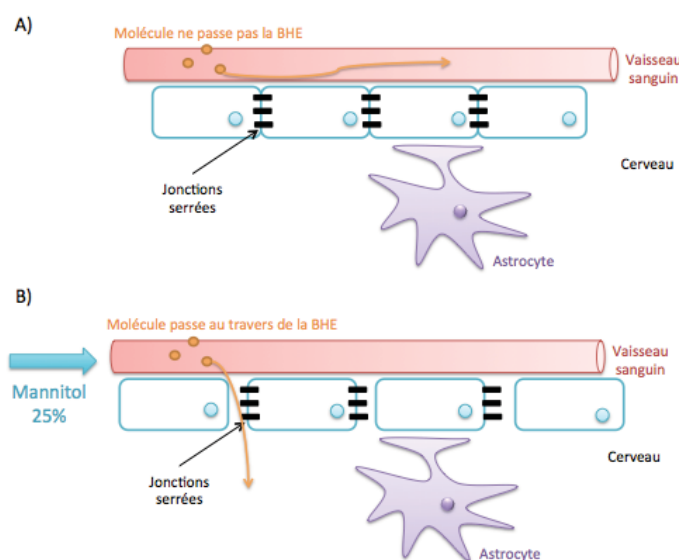


Figure 59. Principe de la rupture de la BHE par injection d'une solution hyperosmolaire de mannitol 25%. A) en condition normales, certaines molécules (en orange) ne peuvent pas franchir la BHE. **B)** l'injection d'une solution hyperosmolaire de mannitol va induire au niveau des cellules endothéliales de la BHE choc osmotique qui va conduire à la rupture des jonctions serrées entre ces cellules. Ainsi, certaines molécules pourront désormais franchir la BHE pour atteindre le cerveau.

- L'utilisation d'**ultrasons** afin d'induire une rupture focale et transitoire de la BHE (ou FUS pour *Focused UltraSound* en anglais). Récemment, des systèmes d'ultrasons, compatibles avec l'imageur IRM, ont été mis en place (Kinoshita et al. 2006; Wang et al. 2009; Aryal et al. 2014). Leur utilisation couplée à injection de micro-bulles dans le sang conduit à une rupture focale de la BHE par sonication des micro-bulles.

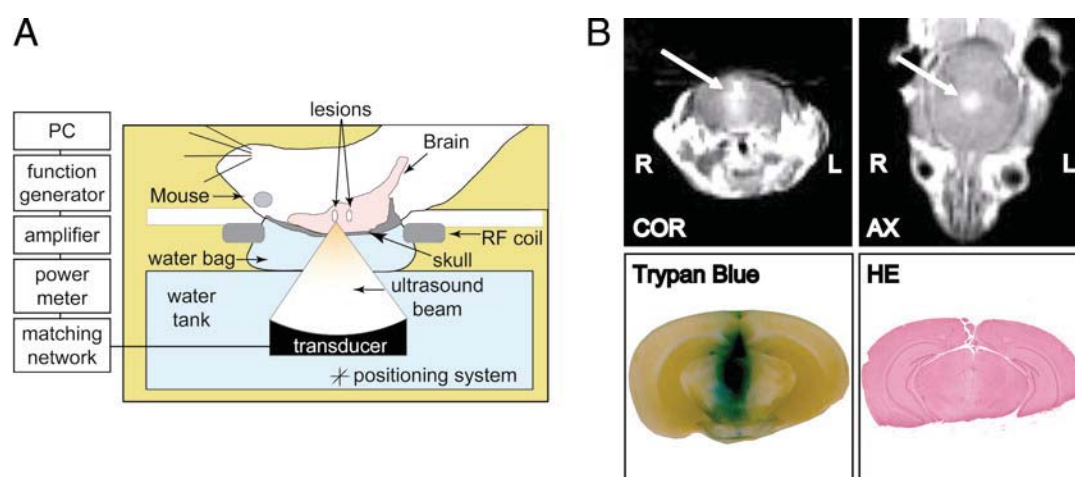
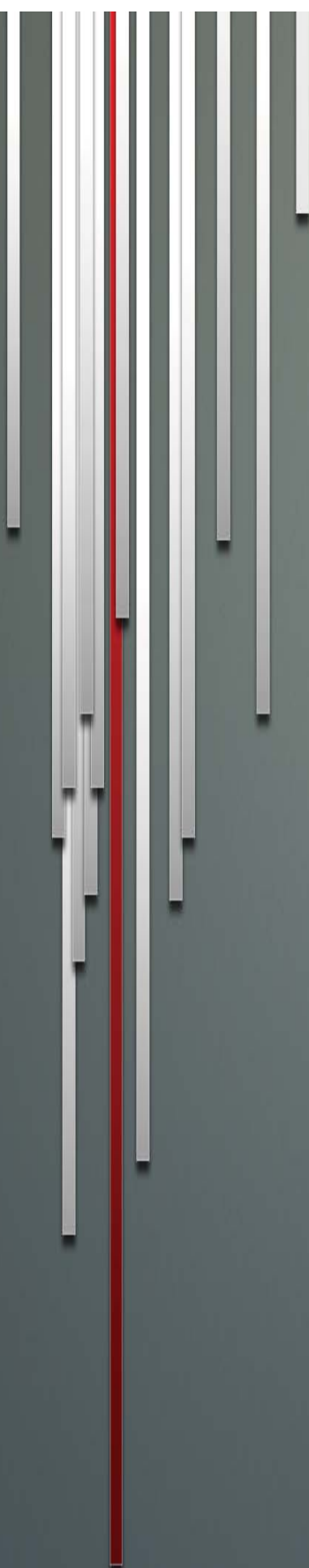


Figure 60. Rupture transitoire de la BHE induite par les ultrasons. A) Schéma du système de génération des ultrasons, IRM compatible. B) En haut : les ultrasons entraîne une rupture temporaire de la BHE révélée en imagerie par un hyper signal du aux agents de contraste. En bas à gauche : validation de la rupture de la BHE par coloration au Bleu Evans. En bas à droite : aucune lésion n'est visible après coloration à l'hématoxyline-éosine (Kinoshita et al. 2006).

- **L'utilisation d'anticorps dirigés contre des antigènes de la BHE.** Cette technique permettrait une ouverture de la BHE sur une durée de 2,5h (Lu et al. 2010). Cependant peu d'études utilisent cette technique à l'heure actuelle.

Ainsi, dans cette seconde partie de ce projet de thèse, nous avons choisi de mettre au point une nouvelle stratégie pour le suivi du métabolisme glutamate-glutamine grâce à la PDN couplée à la SRM du ^{13}C . Afin de cibler directement ce cycle, le précurseur choisi pour la PDN est le glutamate hyperpolarisé. Le glutamate ne traversant pas la BHE, un protocole de rupture de la BHE par injection d'une solution hyperosmolaire de mannitol a été mis en place. Le développement de cette nouvelle méthodologie a été réalisé dans ce travail de thèse sur des animaux contrôlés.

Les travaux réalisés au cours de ce projet de thèse font l'objet de 2 publications scientifiques. La première est en cours de revue dans le journal Annals of Neurology. La seconde est en préparation avant soumission.

A series of vertical bars of varying heights and widths are positioned on the left side of the page. Most are light gray, but one bar is a distinct red color. They appear to be part of a decorative graphic element.

Publications
scientifiques

Article I



*La spectroscopie du proton pour le diagnostique
et l'évaluation de l'efficacité du traitement
dans la maladie de Parkinson*

Avant-propos

Comme nous venons de le voir dans la partie comportant les rappels de bibliographie l'examen diagnostique de la maladie de Parkinson reste à l'heure actuelle principalement basé sur des critères cliniques. Si l'imagerie TEP et SPECT permettent l'évaluation de la dénervation dopaminergique, ces techniques restent peu exploitées en raison notamment de leur coût élevé et leur caractère invasif liés à l'injection de produits radio-marqués. En revanche, l'IRM est une des techniques d'imagerie diagnostique la plus largement utilisée en clinique. Doublement informative, elle apporte des renseignements autant structuraux grâce à l'IRM, que métaboliques grâce à la SRM, permettant ainsi le diagnostic et la caractérisation des modifications d'une structure en situation pathologique.

Dans la maladie de Parkinson, la perte des neurones dopaminergiques de la SN n'entraîne pas de modifications structurales majeures visibles rapidement en IRM. Néanmoins, les études réalisées chez des animaux modèles de la maladie ont montré des adaptations du métabolisme glutamatergique dans le striatum suite à la perte des neurones dopaminergiques dans la SN. Ces études menées en électrophysiologie, microdialyse et SRM au niveau du striatum montrent une augmentation de la transmission glutamatergique en provenance du cortex associée à une plasticité synaptique et des modifications du microenvironnement glial suggérant une implication du cycle glutamate-glutamine dans la pathologie. De plus, un traitement aigu à la L-dopa entraîne une normalisation des concentrations élevées en glutamate.

Ces observations effectuées en recherche pré-clinique nous ont conduit à la formulation des interrogations suivantes:

- Les changements du métabolisme glutamatergique observés en SRM chez les modèles animaux de la maladie de Parkinson sont-ils retrouvés chez l'Homme ? D'autres changements peuvent-ils être observés ?
- Si des variations existent, peuvent-elles être utilisées comme des marqueurs diagnostiques de la maladie ?
- Quel est l'impact des traitements dopaminergiques sur le métabolisme cérébral chez les patients parkinsoniens ?

Ainsi dans ce premier travail, l'objectif est de comparer le profil métabolique de patients parkinsoniens à celui de volontaires sains afin d'identifier des marqueurs permettant de diagnostiquer la maladie par SRM du ^1H . Dans cette étude, nous avons choisi de suivre également la réponse métabolique à la prise du traitement dopaminergique afin d'identifier des marqueurs permettant d'évaluer la réponse thérapeutique.

Aux vues de la littérature sur les changements glutamatergique ayant lieu chez l'animal modèle de la maladie, une attention particulière a été portée à l'évaluation des concentrations en glutamate et glutamine dans le cerveau. Pour cela, une approche de SRM du ^1H monovoxel à temps d'écho court (29ms) a été réalisée. Le voxel de 1cm^3 est placé au niveau du putamen. L'acquisition est réalisée de façon bilatérale. 20 patients parkinsoniens ont été recrutés pour cette étude et comparés à 20 volontaires sains appariés en âge et en genre. L'examen chez les patients parkinsoniens est effectué après une période de 12h sans prise de traitement et 1h après la prise de 200 mg de L-dopa. Afin d'évaluer l'effet du traitement sur le métabolisme cérébral, le design de l'étude a été réalisé selon un schéma de cross over randomisé. La quantification des métabolites a été effectuée par rapport au signal interne de l'eau grâce au logiciel LCModel.

Cette étude a révélé des changements métaboliques au sein du putamen, notamment une **baisse significative des concentrations en M-Ins, NAA et tCr chez les patients parkinsoniens** comparé aux individus sains. Cependant, contrairement aux résultats obtenus chez l'animal nous n'avons **pas observé de modifications des taux de glutamate et glutamine** dans le cerveau des patients parkinsoniens comparé aux volontaires sains. Si le traitement dopaminergique n'a pas d'effet sur la concentration en M-Ins, on assiste à une **normalisation des concentrations en tNAA et tCr suite à la prise de L-dopa.**

Ainsi les modifications des concentrations en NAA et tCr suggèrent des modifications du statut énergétique des cellules avec une restauration du phénotype suite à la prise de L-dopa. De façon intéressante, une baisse significative de la concentration en M-Ins est observée. Cette diminution pourrait représenter le vestige d'une hyperactivité glutamatergique passée.

Ce travail, soumis à annals of neurology le 19 Juin 2014, est actuellement en cours de relecture par le journal.

¹H magnetic resonance spectroscopy for diagnosis and evaluation of treatment efficiency in Parkinson's disease.

**Leslie Mazuel^a, Carine Chassain, PhD^b, Betty Jean, MD^b, Bruno Pereira, PhD^c,
Aurélie Cladière^b, Claudine Speziale^b and Franck Durif, MD, PhD^{a,d,*}**

a) Auvergne University, UFR Medicine, EA7280, Clermont-Ferrand, France

b) CHU Gabriel Montpied, Centre d'Imagerie par Résonance Magnétique, Clermont-Ferrand, France

c) CHU Gabriel Montpied, DRCI, Clermont-Ferrand, France

d) CHU Gabriel Montpied, Service de Neurologie, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Objective: To assess the neurochemical profile in the putamen of parkinsonian patients under L-DOPA treatment (drug-ON) or after a withdrawal of L-DOPA medication (drug-OFF) compared to healthy volunteers in order to identify biomarkers of Parkinson's disease sensitive to dopaminergic treatment.

Methods: For this, a short-echo-time (29 ms) single-voxel (1cm³) 1H MRS approach was used at 3T to explore metabolic profile in the putamen of patients with Parkinson's disease. Spectra obtained from 20 healthy volunteers were blindly-compared to 20 parkinsonian patients in drug-ON and drug-OFF conditions to evaluate the accuracy of biomarkers for Parkinson's disease diagnosis and for the evaluation of L-DOPA treatment efficacy in a randomized cross-over study.

Results: Analysis with LC model showed significantly lower putamen concentrations of tNAA, tCr and m-Ins in drug-OFF parkinsonian patients compared to healthy volunteers ($p \leq 0.01$). Moreover, L-DOPA treatment restored tNAA and tCr levels ($p \leq 0.01$) while m-Ins levels remained unchanged. No changes in Glx and Cho were observed in drug-OFF or drug-ON condition compared to controls.

Interpretation: We identified three biomarkers of Parkinson's disease in the putamen (tNAA, tCr, m-Ins). Despite promising results with MRS on animal models of Parkinson's disease, short-echo-time 1H MRS was unable to identify Glx modifications in our patient cohort. However, after studying the role of m-Ins in the central nervous system, we concluded that m-Ins could indirectly reflect the glutamine pools inside the putamen and might thus be used as a marker of Parkinson's disease.

Introduction


Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the degeneration of dopaminergic neurons inside the substantia nigra pars compacta, leading to the appearance of motor troubles¹. Currently, PD diagnosis is still based on clinical signs, with a clinical diagnosis accuracy less than 90%². Thus, it is crucial to identify markers that allow early accurate diagnosis of PD, assessment of progression rate and evaluation of responsiveness to treatment.

MRS can measure brain metabolite concentrations in a structure of interest and thus track neurochemical alterations in a disease context. In PD, ¹H MRS studies performed on the SN of parkinsonian patients have shown contradictory results^{3,4}. A study found no difference in tNAA/tCr ratio between patients with Parkinson's disease and controls⁵ whereas recent works using 3D MRSI showed rostral-to-caudal variation in tNAA/tCr ratio in patients with a clear differentiation between idiopathic PD and atypical parkinsonian syndromes^{4,6}. Differences in SN metabolite levels^{3,6} could be due to the poor SNR in this deep structure with high iron content. Consequently, efforts to identify markers of PD have turned to structures like the striatum to which the SN is known to send dense dopaminergic afferent projection⁷.

In the putamen, ¹H MRS spectra have shown a lower tNAA/tCr ratio in parkinsonian patients compared to healthy controls⁸ whereas other studies observed no change^{9,10,11,12}. Absolute quantitation after short-echo-time 1H MRS have shown no change in Glx or in individual Glu and Gln levels^{3,13}. However, at 7T, Parkinson's disease patient putamen showed significantly higher GABA than controls³. The only ¹H MRS study (led at 1.5 T) assessing role of L-DOPA in human cerebral metabolism failed to show a change of tNAA, tCr and tCho levels after acute L-DOPA administration¹³.

Higher-magnetic-field MRS studies in rodent models of Parkinson's disease found alterations in several metabolites such as GABA, Glu and Gln in the putamen^{14,15,16} and animal studies have shown that acute L-DOPA administration normalizes these alterations^{15,16}.

In this study, we employed a short-echo time monovoxel ¹H MRS approach to follow neurochemical profile changes in the putamen of parkinsonian patients according to the medication condition in a randomized crossover design. Results were compared to matched healthy volunteers. The availability of a high-magnetic-field magnet (3T) combined with a 32-channels head coil gives us the sensitivity advantage needed to explore in-brain metabolism. Thus, by following the effect of dopaminergic



therapy, this study also yields information on the changes in brain metabolites linked to levodopa responsiveness.

Materials and methods


Study design. A randomized clinical trial was performed using a crossover design.

Subjects. This study included 20 patients with PD that were compared to 20 healthy age-matched and sex-matched subjects with no history of neurological disorders. Parkinsonian patients with a minimum 5-year history of the disease were recruited after fully filling the UK PD Brain Bank criteria for idiopathic PD¹⁷. Parkinsonian patients were recruited by movement disorder specialists at University Hospital in Clermont-Ferrand, France.

Parkinsonian patients with deep brain stimulation, rest tremor (>3 on one sub-item of the “tremor” item of Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS) part III), levodopa-induced dyskinesia in “ON” state (motion incompatible with MRS examination) and dementia (as assessed by DSM-IV criteria) were excluded. Healthy volunteers were recruited among relatives of patients. For each group, any subjects with brain disease, MRI contraindications or on any medication that could interact with brain neurotransmitters (antidepressant, neuroleptics) were excluded.

The protocol was approved by the Regional Medical School Ethics Committee (file AU-851). Healthy volunteers and parkinsonian patients gave informed consent according to the guidelines of the French national health authorities and the Declaration of Helsinki. Parkinsonian patients arrived at the MRI department in the morning (8 a.m) in drug-OFF condition (drug-OFF) after withdrawal any anti-parkinsonian medication at least 12 h prior to MRS. MRS was performed twice in drug-OFF condition and in drug-ON condition (drug-ON). For drug-ON, patients received an acute 200 mg L-DOPA dose (Modopar Dispersible, Roche) while in drug-OFF condition. MRS was performed one hour later when parkinsonian symptoms improved. Improvement was confirmed by a neurologist specialized in movement disorders and also by the patients themselves. The two MRS assessments were always performed at least one week apart. Assignment to drug-OFF or drug-ON condition at the first MRS was done using permuted-block randomization.

Clinical symptoms were assessed in both drug-ON and drug-OFF condition using the UPDRS. Healthy volunteer had only one 1H MRS exam. L-DOPA Equivalent Daily Dose (LEDD) was estimated according to Tomlinson et al¹⁸.



MRI and MRS. Imaging and ^1H MRS experiments were performed on a GE 3T MR750 scanner (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) using a 32-channel head coil. Foam padding and paper tape was used to restrict motion within the scanner. Conventional magnetic resonance images were obtained using a 3D T_1 Inversion Recovery sequence [TR (repetition time) = 8.8 s, TE (echo time) = 3.5 ms, TI (inversion time) = 400 ms, slice thickness = 1.2 mm, FOV (field of view) = 24 cm, flip angle = 12° , NEX (number of excitations) = 1, resolution = 288×288] (Fig 1).

^1H MRS was performed with a Point-RESolved Spectroscopy sequence, single-voxel proton brain exam (PROBE/SV) sequence. This volume-localized sequence was used with CHES water suppression and outer-volume suppression contiguous to the single volume of interest in the three dimensions. Four other outer-volume suppressions were placed far from the volume of interest at the brain/bone interface. The selected 1cm^3 voxel position was determined by examining the magnetic resonance T_1 images in all three dimensions (sagittal, coronal, and axial planes). The putamen was located by the varying contrast between white matter and gray matter and the globus pallidus. The voxel was placed as posterior as possible in the putamen. Automatic shimming was conducted before the spectra were obtained. After shimming, values obtained for water suppression and spectral line width were considered as acceptable at 95% and 15 Hz, respectively. For each subject, a single-voxel spectroscopy was conducted inside the right and left putamen (Fig 1).

MRS analysis. All spectra were processed using LCModel software version 6.3¹⁹ which uses Bayesian analysis starting with solution spectra basis sets to provide estimates of metabolite concentrations without operator bias. The LCModel reference for metabolite quantification used the unsuppressed water signal collected automatically by the PROBE/SV sequence. Spectra were included in the final analysis based on quality criteria defined by objective output parameters from the LCModel analysis: sufficient spectral resolution (full width at half minimum <0.1 ppm.), sufficient information ($\text{SNR} > 4$) and residuals that were randomly scattered about zero to indicate a reasonable fit. The following neurochemicals were evaluated: total tNAA, tCr, tCho, m-Ins, Glx. In this study, quantification estimates for tNAA, tCr, tCho and Glx were included for CRLB (percentage of standard deviation) $\leq 25\%$. Values are expressed as mean \pm sem. Percentage voxel coverage was estimated using Gimp2.6.11 (image registration toolbox) in order to assess the reproducibility of the voxel location between the two MRS sessions.


Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Stata 13 software (StataCorp LP, College Station, TX, US). The tests were two-sided, with a Type I error set at $\alpha = 0.05$ (except for multiple

comparisons). Quantitative data were presented as mean (\pm standard-deviation) or median [interquartile range] for continuous data (assumption of normality assessed using the Shapiro–Wilk test) and as the number of patients and associated percentages for categorical parameters. Values of the two voxels obtained for each side of brain were averaged. The comparisons between the healthy subjects and the parkinsonian patients estimated in situation drug-ON or drug-OFF were realized by random-effects models 1) taking into account the within and between subject variability, 2) studying the (fixed) effect group and 3) adjusting on relevant clinical parameters as age, duration of the disease, score of UPDRS III in drug-ON and in drug-OFF conditions. To study the relations between quantitative data, correlation coefficients (Pearson or Spearman according to statistical distribution) were calculated. Clinical data statistical analysis was performed using a paired Student's t-test comparing data for each group. Values are expressed as mean \pm SD.

Results

Participants. Characteristics of patients and healthy volunteers are reported in Table 1. 95% of the patients received L-DOPA, 70% monoamine oxidase inhibitor B (IMAOB), 45% catechol-o-methyl transferase inhibitor (ICOMT), and 15% dopaminergic agonists. Patients with Parkinson's disease had significant lower UPDRS III scores in drug-ON than drug-OFF condition (3.6 ± 3.4 vs 13.4 ± 8.3 , $t=6.96$; $***p<0.001$). Session-on-session percentage of voxel coverage was estimated in all 3 planes for each patient. Average all-parkinsonian patient voxel coverage was $83.9\pm 7.3\%$.

¹H MRS. Quantitative analysis was run for each spectra set coming from the right and left putamen for each patient (Fig 2). As no difference between each side was observed, values of the two voxels obtained for each side were averaged. Analysis with LCModel showed lower tNAA concentrations in the putamen of parkinsonian patients in drug-OFF condition compared to healthy volunteers (8.1 ± 0.2 mM vs 9.4 ± 0.4 mM; $p<0.01$) and increased significantly after drug-ON (8.1 ± 0.2 mM vs 9.1 ± 0.4 mM; $p<0.01$) to a level not significantly different from healthy volunteers (9.1 ± 0.4 mM vs 9.4 ± 0.4 mM). Similarly, tCr concentrations were also lower in parkinsonian patients in drug-OFF condition than in healthy volunteers (7.5 ± 0.2 mM vs 8.3 ± 0.3 mM; $p<0.01$) and increased significantly after drug-ON compared to drug-OFF (8.1 ± 0.2 mM vs 7.5 ± 0.2 mM; $p<0.01$) to a level not significantly different from healthy volunteers (8.1 ± 0.3 mM vs 8.3 ± 0.3 mM). No changes in tCho were observed between healthy volunteers and parkinsonian patients in drug-OFF or drug-ON condition. Interestingly, parkinsonian patients in OFF drug condition showed significantly lower m-Ins than healthy volunteers (3.8 ± 0.3 mM vs 5.6 ± 0.4 mM; $p<0.001$) and this drop was not reversed in drug-ON condition (3.8 ± 0.3



mM vs 4.3 ± 0.3 mM). We observed no changes in Glx between healthy volunteers and patients in drug-OFF or drug-ON condition (Fig 3).


There was no significant relationship between each metabolite, the UPDRS III score assessed in drug-OFF or drug-ON conditions and the duration of the disease. However, A weak correlation was shown between Glx levels and UPDRS III score in parkinsonian patient in drug-OFF condition ($r=0.337$; $p=0.05$).

Discussion

This ^1H MRS study showed that patients with moderate PD had lower putamen m-Ins, tCr and tNAA levels in drug-OFF condition vs healthy controls. Moreover, this original work showed significant changes in brain metabolism after acute L-DOPA administration. L-DOPA therapy increased tCr and tNAA to levels not significantly different from controls, but had no effect on m-Ins concentrations.

The quantitation of absolute tNAA revealed lower tNAA levels in the putamen of drug-OFF parkinsonian patients vs. controls, consistently with previous work quantifying tNAA relative to tCr⁸. NAA is the second-most-abundant free amino acid in the brain and is localized exclusively inside neurons, making it a marker of neuronal integrity in MRS^{20 21}. NAA synthesis takes place inside neuronal mitochondria²², and there is evidence of a direct relationship between NAA synthesis, oxygen consumption and ATP production in mitochondria²³. The reduced tNAA levels in parkinsonian patients observed here could suggest mitochondrial dysfunction rather than neuronal loss inside the putamen. Indeed, a study reported how mitochondrial energy state was important to NAA synthesis and postulated that the decrease in tNAA levels seen in disease states by ^1H NMR spectroscopy may primarily point to impaired neural mitochondrial energy production rather than neuronal cell loss²⁴. Furthermore, study on rat and primate models of progressive striatal neurodegeneration induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3-NP) showed a decrease of tNAA in the striatum that was reversible in time²⁵. Interestingly, after acute L-DOPA treatment, tNAA concentration increased to a level not significantly different from controls. These findings provide indirect support for a dopamine effect in increasing neuronal function after acute administration and thus suggest that neural mitochondrial dysfunction in the putamen is reversible.

This study found decreased tCr in the putamen of parkinsonian patients in drug-OFF condition compared to healthy controls. Cr is considered a marker of brain energy metabolism²⁶. Previous MRS studies in PD generally assess metabolite levels such as intensity of tNAA to tCr ratio. However, due




to regional and individual variability, care is warranted if using tCr as reference. The reduced tCr levels observed in the putamen of parkinsonian patients could reflect a lower brain energy metabolism inside this structure. ¹H-MRS and ³¹P-MRS studies have shown decreased tCr associated with decreased PCr and ATP levels in putamen of parkinsonian patients²⁷ but no changes in PCr or ATP in basal ganglia in Parkinson's disease^{3 28}. Moreover, the source of this discrepancy could be explained by sex differences in brain energy metabolism in PD²⁹. Reduced putaminal tCr levels could thus indicate a restricted capacity of neurons and/or glia to supply the energy demand. Our study found that tCr levels normalized after L-DOPA treatment. Thus, reduced tCr level in PD and increased tCr after dopaminergic treatment support the hypothesis of an L-DOPA-induced re-activation of the neuronal/glial metabolism.

Taken together, the co-decrease in tNAA and tCr observed in drug-OFF conditions could indicate a mitochondrial dysfunction in the putamen of parkinsonian patients that is re-activated by the L-DOPA therapy.

Interestingly, we found that m-Ins pools were profoundly altered inside the putamen of parkinsonian patients compared to controls. m-Ins is a cyclic sugar alcohol found primarily in brain astrocytes and microglial cells, making it a potential glial marker³⁰. Although its functions are not well understood, m-Ins seems to be related to osmolyte agents as storage for glucose and as a second messenger inside the brain³¹. As m-Ins can act as an osmolytic agent, a decrease in m-Ins levels could indicate hypoosmolarity-induced cell swelling, as studies on hepatic encephalopathy show that after hyperammonemia, the intracellular accumulation of Gln leads to a decrease in m-Ins due to a modification of cell volume^{32 33}. The decrease in m-Ins observed here could highlight a change in the glial microenvironment in the putamen of parkinsonian patients.

Gln levels could also be used to assess glial microenvironment, as Gln synthesis take place inside astrocytes. Moreover, Gln is the main pathway for recycling Glu pools after neurotransmission. Indeed, synaptic Glu is rapidly taken-up by astrocytes to be converted into its non-toxic metabolite Gln. Gln can then be used to form new Glu molecules inside neurons. Thus, changes in Glx levels could reflect changes in Glu-Gln cycling between neurons and glia. Here, despite a correlation between Glx levels and disease severity in drug-OFF condition, we found no modifications in Glx pools in parkinsonian patients in drug-OFF or drug-ON condition compared to healthy volunteers, in accordance with previous studies^{3 13}. These results diverge from data obtained in animal models. Indeed, MRS studies in animal models of PD (6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions or 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydro pyridine (MPTP) intoxications) suggest that dopaminergic denervation induces hyperactivity of the glutamatergic cortico-striatal pathway, where the elevated Glu




concentrations observed inside the striatum were associated with increased Gln and GABA levels, which points to modified neuron-glia interactions inside this structure after dopaminergic denervation^{14 34}. These results are in agreement with electrophysiological and anatomical studies^{35 36}. As the modifications observed are associated with an acute lesion of the nigro-striatal pathway; changes in Glu and Gln in animal studies might reflect a temporary glial response after lesion¹⁴. An explanation for the unaltered Glx pools observed in our patients could be the fact that lesions in Parkinson's disease are progressive and may thus induce compensatory mechanisms masking the changes in Glx in drug-OFF condition. Furthermore, the chronic dopaminergic treatment used from many years could have blunted the change in Glx levels.

Previous 1.5-T MRS studies in different brain structures of parkinsonian patients have reported conflicting results likely explained by non-homogenous patient groups³⁷. Indeed, these studies mixed parkinsonian patients with or without dopaminergic treatment or with large variation in disease duration. Clinical heterogeneity is almost certainly a key factor in explaining much of the differences observed between the previous studies. This prompted us to select our patients to get a patient group reflecting a moderate disease state (on the basis of duration of disease and Hoehn and Yahr scores) and to assess patients according to their medication conditions in a crossover design.

Basal ganglia nuclei form a deep brain structure that restricts the accuracy of ¹H MRS for precise metabolic analysis. Given this context, our MRS acquisitions were performed at high magnetic field (3T) on a single voxel with 1 cm³ size. Single-voxel spectroscopy was chosen as it offers advantages in terms of accuracy of signal localization, shorter echo-time options, better magnetic field homogeneity after shimming, and thus more effective water signal suppression to enable a better absolute quantification of metabolite concentrations. The voxel size was chosen in order to localize inside the putamen, and so the fraction of white matter within the volume of interest was negligible. This approach makes it possible to obtain a relatively good SNR with resolution close to 15 Hz. Furthermore, to reduce potential SNR bias, a CRLB cut-off (CRLB≤25%) was used to select the reliable concentrations.

Thus, given the combination of blinded randomization of patients with highly-informative short-echo-time single-voxel spectroscopy and automated spectra quantitation, we assume that our results are reliable in our experimental conditions.

This study observed changes in tNAA and tCr levels that could reflect a mitochondrial energy impairment in the putamen of drug-OFF parkinsonian patients that is reversed under dopaminergic treatment, which means tNAA and tCr could be used to assess responsiveness to treatment.



Moreover, we showed, for the first time, a significant decrease in m-Ins levels that could reflect osmotic changes inside astrocytes at early disease stage. Further ^1H MRS studies on metabolic profile at different stages of PD or under different antiparkinsonian medications could pave the way to validating these in-putamen changes as markers of PD.

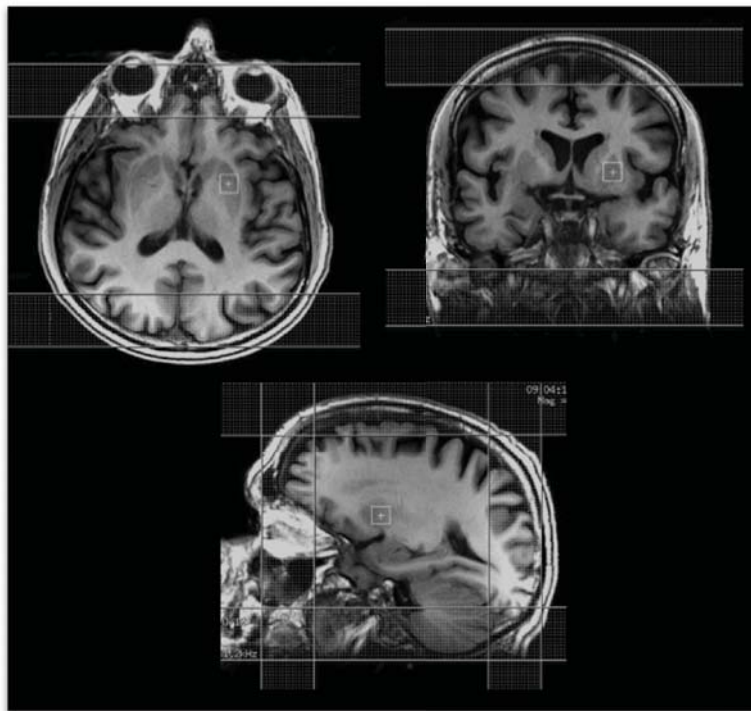


Fig. 1 Voxel location on ^1H anatomic images. Three-plane T_1 -weighted image from a healthy control showing a spectroscopic volume-of-interest located exactly on the left putamen. Volume-of-interest is boxed in white in axial (top left), coronal (top right) and sagittal (bottom) anatomical slices. Four outer-volume suppressions were located at the bone/brain interface.

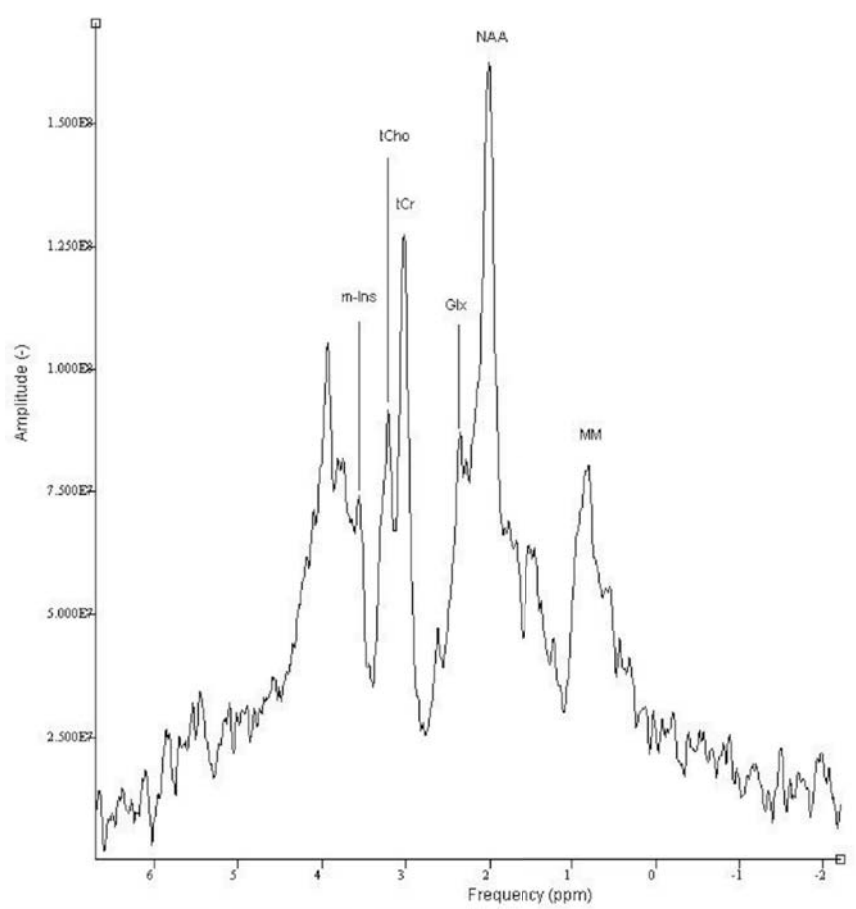


Fig. 2 Proton NMR spectra in the putamen of healthy volunteers obtained from a 1 cm^3 voxel. The resonances of selected metabolites were assigned as following: NAA = 2.008 ppm, tCr (total creatine)= 3.02 ppm, tCho (total choline) = 3.2 ppm, m-ins = 3.56 ppm, Glx (glutamate + glutamine) = 2.05–2.50 ppm, MM (macromolecules) = 0.9–1.3 ppm.

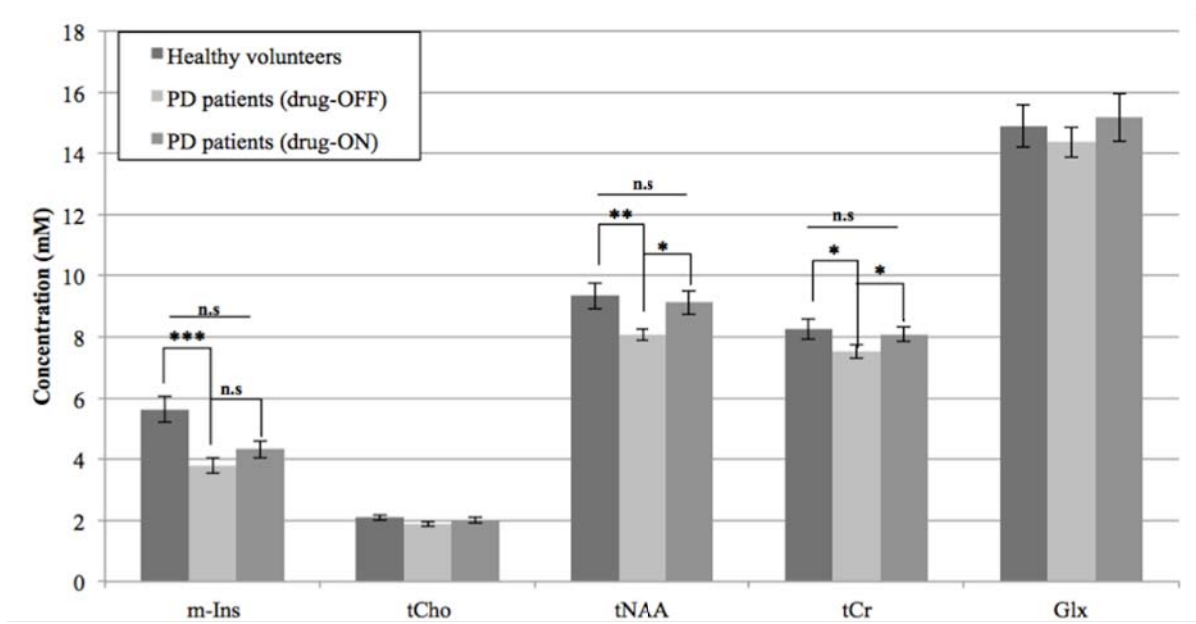



Fig. 3 Metabolite concentrations using LCModel analysis for the two groups of participants. Parkinson's disease patients in drug-OFF (light gray) or drug-ON (medium gray) conditions were compared to healthy volunteers (dark gray). Values are *mean ± sem*. Metabolites that were significantly different between groups are flagged * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Bibliography

- 1- Chaudhuri K, Healy D, Schapira A. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006;5(3):235–245.
- 2- Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. 2001;57(8):1497-1499.
- 3- Emir UE, Tuite PJ, Öz G. Elevated pontine and putamenal GABA levels in mild-moderate Parkinson disease detected by 7 tesla proton MRS. *PLoS One* 2012;7(1):e30918.
- 4- Gröger A, Kolb R, Schäfer R, Klose U. Dopamine reduction in the substantia nigra of Parkinson's disease patients confirmed by in vivo MRS imaging. *PLoS One* 2014;9(1):e84081.
- 5- Nie K, Zhang Y, Huang B, et al. Marked N-acetylaspartate and choline metabolite changes in Parkinson's disease patients with mild cognitive impairment. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2013;19(3):329–34.
- 6- Gröger A, Bender B, Wuster I, et al. Differentiation between idiopathic and atypical parkinsonian syndromes using three-dimensional magnetic resonance spectroscopic imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:644–649.
- 7- Rudkin TM, Arnold DL. Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. *Arch. Neurol.* 1999;56(8):919–26.
- 8- Abe K, Terakawa H, Takanashi M, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of patients with parkinsonism. *Brain Res Bull* 2000;52:589–595.
- 9- Davie C, Wznning G, Barker G, et al. Differentiation of multiple system atrophy from idiopathic Parkinson's disease using proton magnetic resonance spectroscopy. *Ann Neurol* 1995;37:204–210.
- 10- Federico F, Simone I, Lucivero V, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:239–242.
- 11- Guevara C, Blain C, Stahl D, et al. Quantitative magnetic resonance spectroscopic imaging in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy. *Eur J Neurol* 2010;17:1193–1202.

- 
- 12-** Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, et al. Multiple regional ¹H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2004;75(1):103–9.
- 13-** Kickler N, Krack P, Fraix V, et al. Glutamate measurement in Parkinson's disease using MRS at 3 T field strength. *NMR Biomed* 2007;20(8):757–762.
- 14-** Chassain C, Bielicki G, Durand E, et al. Metabolic changes detected by proton magnetic resonance spectroscopy in vivo and in vitro in a murin model of Parkinson's disease, the MPTP-intoxicated mouse. *J. Neurochem.* 2008;105(3):874–82.
- 15-** Chassain C, Bielicki G, Keller C, et al. Metabolic changes detected in vivo by ¹H MRS in the MPTP-intoxicated mouse. *NMR Biomed.* 2010;23(6):547–53.
- 16-** Bagga P, Chugani A, Varadarajan K, Patel A. In vivo NMR studies of regional cerebral energetics in MPTP model of Parkinson's disease: recovery of cerebral metabolism with acute levodopa treatment. *J Neurochem* 2013;127:365–377.
- 17-** Hughes A, Daniel S, Kilford L. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181–184.
- 18-** Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, et al. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2010;25(15):2649–53.
- 19-** Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 1993;30(6):672–9.
- 20-** Moffett JR, Ross B, Arun P, et al. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 2007;81(2):89–131.
- 21-** Moffett JR, Namboodiri MA, Cangro CB, Neale JH. Immunohistochemical localization of N-acetylaspartate in rat brain. *Neuroreport* 1991;2(3):131–4.
- 22-** Patel TB, Clark JB. Synthesis of N-acetyl-L-aspartate by rat brain mitochondria and its involvement in mitochondrial/cytosolic carbon transport. *Biochem. J.* 1979;184(3):539–46.
- 23-** Benarroch E. N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate: Neurobiology and clinical significance. *Neurology* 2008;70:1353–1357.

- 
- 24-** Bates T, Strangward M, Keelan J, et al. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for ¹H MRS studies in vivo. *Neuroreport* 1996;7(8):1397–1400.
- 25-** Demougeot C, Garnier P, Mossiat C, et al. N-acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury. *J Neurochem* 2001;77(2) 408-415.
- 26-** Andres R, Ducray A, Schlattner U, et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2008;76:329–343.
- 27-** Hattingen E, Magerkurth J, Pilatus U, et al. Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain* 2009;132:3285–3297.
- 28-** Weiduschat N, Mao X, Beal MF, et al. Usefulness of Proton and Phosphorus MR Spectroscopic Imaging for Early Diagnosis of Parkinson's Disease. *J. Neuroimaging* 2013 doi: 10.1111/jon.12074.
- 29-** Weiduschat N, Mao X, Beal MF, et al. Sex differences in cerebral energy metabolism in Parkinson's disease: A phosphorus magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014;20(5):545–8.
- 30-** Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev. Neurosci.* 1993;15(3-5):289–98.
- 31-** Ross BD. Biochemical considerations in ¹H spectroscopy. Glutamate and glutamine; myo-inositol and related metabolites. *NMR Biomed.* 1991;4(2):59–63.
- 32-** Häussinger D, Laubenberger J, Vom Dahl S, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994;107:1475–1480.
- 33-** Kierans AS, Kirov II, Gonen O, et al. Myoinositol and glutamate complex neurometabolite abnormality after mild traumatic brain injury. *Neurology* 2014;82(6):521–8.
- 34-** Coune P, Craveiro M, Gaugler M, et al. An ultrahigh field 14.1T ¹H-MRS study on 6-OHDA and α -synuclein-based rat models of Parkinson's disease: GABA as an early disease marker. *NMR Biomed* 2013;26:43–50.
- 35-** Calabresi P, Mercuri N, Sancesario G, Bernardi G. Electrophysiology of dopamine denervated striatal neurons: implications for Parkinson's disease. *Brain* 1996;116:433–452.



36- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2000;62:63–88.

37- Levin B, Katzen H, Maudsley A, et al. Whole brain proton MR spectroscopic imaging in Parkinson's disease. *J Neuroimaging* 2014;24(1):39–44.

Article II



Hyperpolarisation du ^{13}C : une nouvelle voie pour le suivi du cycle glutamate-glutamine in vivo dans le cerveau. Etude de faisabilité chez le rongeur.

Avant-propos

Ce second travail s'inscrit dans la lignée des résultats précédemment obtenus dans l'équipe montrant, par SRM, des variations du métabolisme glutamatergique dans le striatum chez le rongeur modèle de la maladie de Parkinson (Chassain et al. 2005, Chassain et al. 2008, Chassain et al. 2010). Face aux limitations de la SRM du ^{13}C classique qui sont d'une part la faible sensibilité et d'autre part le manque de résolution temporelle, nous avons choisi de développer une nouvelle technique permettant l'augmentation artificielle du signal RMN du ^{13}C afin de pouvoir suivre de façon dynamique les changements de cinétique enzymatiques de ce cycle en condition pathologique. Cette technique est l'hyperpolarisation du ^{13}C par PDN.

L'objectif de ce second travail est donc de mettre en place la PDN à Clermont-Ferrand et d'utiliser cette technique afin de suivre de façon dynamique les adaptations du cycle glutamate-glutamine *in vivo* dans le cerveau en condition normale ou pathologique.

Pour cela, la première phase de ce projet a consisté à la mise en place méthodologique de la PDN sur le site du CHU Gabriel Montpied de Clermont-ferrand. L'ensemble de la procédure, polarisation, dissolution, injection *in vivo* à l'animal et détection du signal a été validé à partir de la polarisation du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate. Cette dernière étant largement décrite dans la littérature, elle fût un moyen rapide de mettre en place la PDN sur le site.

Suite aux nombreux ajustements sur le plan de la PDN du pyruvate, des premiers essais de détection *in vitro* ont été réalisés à 3T. Ces premières expériences nous ont permis d'estimer le taux de polarisation de nos échantillons ainsi que le temps de relaxation avant de passer aux expériences chez l'animal. Les résultats obtenus ont révélé un taux de polarisation de nos échantillons de 23% avec un T_1 d'environ 60s, comparables aux données de la littérature.

Les premières acquisitions de SRM ont été réalisées chez le rat sain suite à l'injection intraveineuse de $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé. Différentes stratégies d'acquisition du signal ont été testées afin d'optimiser la détection du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate et de ces métabolites dans le cerveau. Cette détection a tout d'abord été réalisée sur une tranche passant par la tête du rat (Figure 61), puis avec une

séquence de CSI afin de déterminer la composante du signal présente dans le cerveau (Figure 62) et enfin avec la séquence IDEAL disposant d'une meilleure résolution spatiale et temporelle (Figure 63).

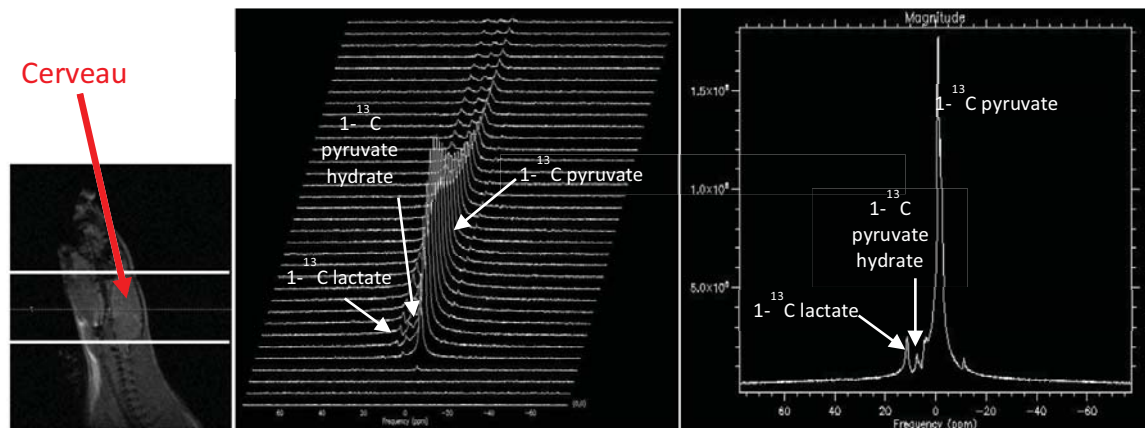


Figure 61. Détection du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate et de ses métabolites dans une coupe passant par le cerveau de l'animal. A gauche : représentation de la coupe utilisé sur l'image anatomique. Au milieu : représentation temporelle de chaque acquisition ^{13}C ; le signal du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate et également celui du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate hydrate et du $[1-^{13}\text{C}]$ lactate sont visibles. A droite : somme des acquisitions. (Paramètres utilisés : TR 2s, FA 10°, épaisseur de la coupe 20 mm, largeur spectrale 5000 Hz, fréquence centrée sur le signal du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate).

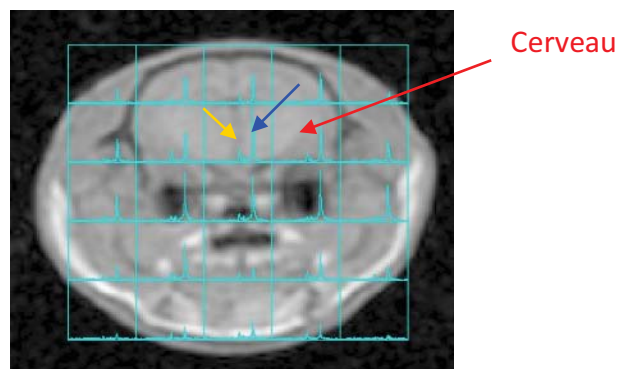


Figure 62. Détection du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate et de ses métabolites dans le cerveau du rat sain grâce à une séquence de FIDCSI après l'injection du produit polarisé. On voit bien le signal du pyruvate et du lactate dans le cerveau de l'animal. (FA 30, TR 3s, fréquence centrée sur la détection du lactate, épaisseur de la coupe 20mm). Le pic de $[1-^{13}\text{C}]$ lactate est indiqué par une flèche jaune, celui du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate par une flèche bleue.

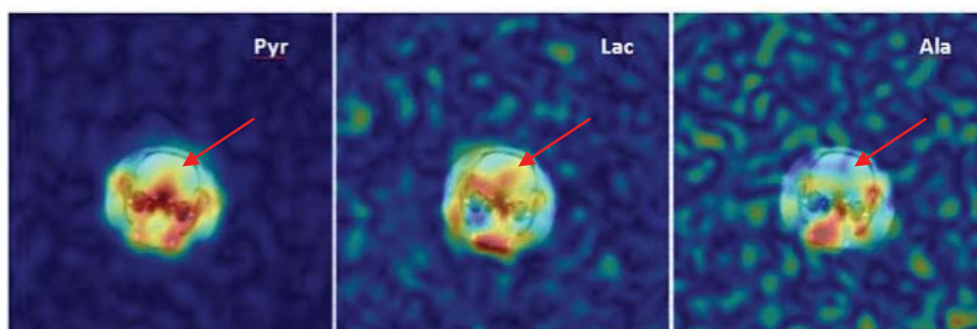


Figure 63. Détection du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate et de ses métabolites dans le cerveau du rat sain grâce à la séquence IDEAL à $t=3\text{s}$ après l'injection du produit polarisé. On voit bien le signal du pyruvate et du lactate dans le cerveau de l'animal. (FA pyruvate 15°, FA lactate 30°, FA alanine 30°, TR 500ms, épaisseur de la coupe 15mm). Le cerveau est indiqué par une flèche rouge.

Cette étape de polarisation du [1-¹³C] pyruvate nous a permis de montrer la faisabilité de la détection du métabolisme cérébral chez l'animal sur notre système à 3T. Le métabolisme du pyruvate n'ayant pas d'intérêt majeur dans l'étude de la pathologie parkinsonienne, nous nous sommes dirigés vers la polarisation d'un nouveau précurseur dans le but de suivre de façon dynamique le cycle glutamate-glutamine *in vivo*.

Ainsi dans la seconde phase de ce projet, après étude fine de la bibliographie, nous avons choisi d'utiliser la **PDN du [1-¹³C] glutamate**, précurseur pour le suivi du cycle glutamate-glutamine. Bien qu'il présente l'avantage d'être facilement polarisable et de conduire directement à la synthèse de glutamine, l'un des inconvénients majeurs à l'utilisation du glutamate est son absence de transporteurs au niveau de la BHE. Pour pallier à ce problème, nous avons implémenté un **protocole de rupture de la BHE**. Au regard des différentes techniques existantes, notre choix s'est tourné vers une l'utilisation d'une **solution hyperosmolaire de mannitol 25%**. Cette technique permet une ouverture réversible de la BHE sur une fenêtre de temps d'environ 10min. Ainsi l'injection de mannitol 25% préalable à l'injection du produit marqué permet au [1-¹³C] glutamate de pénétrer dans le cerveau pour y être métabolisé. L'injection de mannitol est réalisée de façon rétrograde dans l'artère carotide. Cette voie d'administration est également utilisée pour l'injection du produit marqué.

Nos résultats montrent pour la **première fois que le métabolisme du glutamate peut être observé** de façon dynamique dans le cerveau du rat. Dans nos conditions expérimentales, le glutamate semble être métabolisé de façon privilégiée en **glutamine** au regard de la correspondance des déplacements chimiques (décalage chimique de 0,5ppm entre les 2 pics). Ainsi, le protocole d'ouverture de la BHE ouvre une nouvelle voie pour l'étude du métabolisme cérébral à d'autres précurseurs ne passant habituellement pas la BHE ou trop lentement.

Ainsi ce second travail montre l'intérêt de la PDN pour le suivi du cycle glutamate-glutamine de façon dynamique *in vivo*. Il est actuellement en cours de préparation en vue d'une soumission.

Hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging: a new-way to follow the glutamate-glutamine cycle *in vivo* in the brain

**Leslie Mazuel^a, Carine Chassain, PhD^b, Betty Jean, MD^b, Aurélie Cladière^b,
Claudine Speziale^b, Rolf Schulte, PhD^c and Franck Durif, MD, PhD^{a,d,*}**

a) Auvergne University, UFR Medicine, EA7280, Clermont-Ferrand, France

b) CHU Gabriel Montpied, Centre d'Imagerie par Résonance Magnétique, Clermont-Ferrand, France

c) GE Global Research, Munich, Allemagne

d) CHU Gabriel Montpied, Service de Neurologie, Clermont-Ferrand, France



Abstract

Change in glutamate levels is involved in number of neurodegenerative diseases. By the way to better understand the relationship between neurons and astrocytes, we use ^{13}C NMR spectroscopy and the highly amplified signal generated by hyperpolarization to achieve both spatial and temporal resolution adequate for *in vivo* metabolism studies of the glutamate-glutamine cycle. By the implementation of a blood-brain barrier disruption protocol, we showed that hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate can be imaged *in vivo* inside the rat brain and the synthesis of its metabolite $[1-^{13}\text{C}]$ glutamine can be monitored in real-time. Thus, hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate could be a promising substrate for evaluation of glutamate-glutamine cycle activity in conjunction with neurodegenerative diseases.

Introduction

In the normal brain, Glu represents the major excitatory neurotransmitter. The prominent glutamatergic pathways are: the cortico-cortical pathways; the pathways between the thalamus and the cortex; and the extrapyramidal pathway (the projections between the cortex and striatum). Other glutamate projections exist between the cortex, substantia nigra, subthalamic nucleus and pallidum. Glutamate-containing neuronal terminals are ubiquitous in the central nervous system and their importance in cerebral activity and neurotransmission is considerable¹. After nervous influx, the Glu released in the extracellular space is rapidly cleared from the synaptic cleft by astrocytes. Once taken up, Glu is recycled in its inactive form: glutamine (Gln) by the astrocyte-specific enzyme Gln synthase². Then Gln is released from astrocytes, accrued by neurons and converted to Glu by the neuron-specific enzyme glutaminase. This pathway forms the so-called Glu-Gln cycle. The important role of Glu-Gln cycling in the pathogenesis of brain disease is being increasingly recognized³. However, the exact relationships between a disturbance in Glu-Gln equilibrium and pathologies are not fully understood. This has led to increased interest in Glu-Gln quantification in the brain in normal brain function as well as in diseases. Accordingly, magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a powerful *in vivo* technique to detect and quantify Glu-Gln in the brain. Thus, studies using MRS show that change in Glu levels seems to be involved in number of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease^{4,5} or Alzheimer disease⁶.

In vivo real-time study of the Glu-Gln cycle metabolism is a dark box in neurosciences. ¹³C carbon MRS is an informative tool to study the brain metabolism *in vivo*. However, the low gyromagnetic ratio and the low natural abundance of ¹³C combined lead to poor sensitivity of this technique. Thus, ¹³C enriched compound infusions are needed to increase the ¹³C MRS sensitivity *in vivo*. Thus, although conventional ¹³C MRS was used to study this cycle in several studies, results were indirect and need long acquisition time and mathematical modeling to quantify the flux of the Glu-Gln cycle^{7,8}. Especially, ¹³C labeled acetate was used as a key precursor to follow the glial metabolism of Glu. However, the large inflow of unlabeled carbons through the neuronal TCA cycle results in a strong reduction of measured ¹³C signal of Glu and Gln¹⁰. Even if ¹H-¹³C MRS allows the improvement of the detected ¹³C signal, this indirect measurement allows solely a low temporal resolution around a few minutes despite the used of higher magnetic field⁹.

Recently, the development of dynamic nuclear polarization (DNP) applied to ¹³C compound have allowed the overcoming of the low sensitivity of ¹³C MRS. DNP increases the ¹³C signal to 10000 fold and thus enables real-time metabolism visualization with high sensitivity in order to provide a unique information about the enzymatic processes^{11,12,13}. However, the main drawback of DNP is the short

half-life of the polarized signal that restricts the signal detection in time. Thus, care must be taken to choose the best ^{13}C labeled precursor¹⁴.

To date, $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate has been the more widely hyperpolarized compound used because of its long T_1 relaxation time and its key role in cellular energy metabolism. In accordance with the “Warburg effect” describing the change of energy status in cancer, exchange between hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate and lactate was shown to be a hallmark of tumor metabolism in animal models^{15 16 17 18} and also in patients¹⁹. Inside the brain, pyruvate metabolism has been used to follow the *in vivo* brain metabolism of rodent^{20 21 22} and primate²³. Studies were also done in glioma^{15 24 25} and therapy efficiency such as chemotherapy^{26 27} and radiotherapy were studied¹⁵.

However, the used of $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate is restricted. Indeed, the downstream metabolism of $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate through the tricarboxylic acid (TCA) cycle cannot be observed as the C1 labeled carbon is lost when forming the TCA cycle precursor acetyl-coA. Thus, the use of other TCA precursors such as $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate and $[1-^{13}\text{C}]$ acetate were purpose to study this metabolic pathway in the rodent brain. If hyperpolarized experiment on the direct TCA cycle precursor $[1-^{13}\text{C}]$ acetate only allowed the detection of 2-oxoglutarate²⁸, study on $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate showed the appearance of various TCA cycle intermediary up to $[5-^{13}\text{C}]$ glutamate synthesis²⁹ but this result was not reproduced by others groups²¹.

In order to observe further steps in TCA cycle and direct related synthesis such as Glu and Gln, hyperpolarization of new precursors have been used. Especially, a recent report investigated the indirect visualization of Glu synthesis with hyperpolarized 2-ketoisocaproate³⁰. Indeed, branched chain amino acid transaminase (BCAT1) forms leucine from 2-ketoisocaproate in the reaction that converts in parallel Glu into α -ketoglutarate (AKG). In a recent work, hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ α -ketoglutarate was used in the rat brain showing the synthesis of $[1-^{13}\text{C}]$ 2-hydroxyglutarate^{17 18} and $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate¹⁸. However, despite its closer step to the Glu-Gln, Gln synthesis was below the detection level¹⁸. Thus to date, the synthesis of Gln from Glu has been never detected in the brain in real-time way.

Thus this work aimed to use hyperpolarized Glu itself as a precursor of Glu-Gln synthesis after a transient blood brain barrier (BBB) disruption protocol in order to better understand the relationship between neurons and astrocytes.

Materials and methods

Hyperpolarization of [1-¹³C] Glutamate. [1-¹³C] glutamate was polarized using protocol previously described by Gallager et al³². Briefly, [1-¹³C] glutamate (38mM; Sigma Aldrich, France) was dissolved in a mixture of water with 7M Trizma® base (Sigma Aldrich, France), 20mM of the stable trityl radical Ox063 (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) and 1.55mM of a gadolinium chelate (Dotarem, Guerbert, France). The sample was sonicated and vortexed until the contents were fully dissolved. A volume of 30µL was polarized using a HyperSence polarizer (Oxford Instruments, Oxfordshire, UK) for 90 minutes (3.35 Tesla, 1.4 K, 94.101 GHz). Following hyperpolarization, the frozen sample was quickly dissolved in 4 mL of a 40 mM phosphate buffer at pH 7.4. The phosphate buffer also contained 100mg.L⁻¹ diaminoethanetetraacetic acid (Sigma Aldrich, France), sodium and potassium chloride to give a final Na⁺ concentration of 140mM and a final K⁺ concentration of 4mM. It was heated to 180° and pressurized to 10 bar before dissolving the sample.

Relaxation times and polarization level. Experiments were performed on a 3T MR750 Scanner (GE Healthcare, Waukesha, WI) equipped with self-shielded gradients. A dual-tuned (¹H/¹³C) quadrature rodent coil (inner diameter: 30mm; Rapid Biomedical, GmbH, Rimpar, Germany), operating at 127.7MHz and 32.1MHz respectively, was used for both RF excitation and signal reception. Three ¹³C experimentations were performed to measure the means polarization level and the relaxation time. Immediately after dissolution, hyperpolarized [1-¹³C] glutamate was placed in a 1mL syringe. The syringe was quickly placed inside the coil (12s after dissolution process). ¹³C Spectra were acquired using 5° flip angle and a repetition time of 1000ms. A total of 100 scans were acquired to follow the decay of the polarization. The T₁ relaxation time of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate was determined by performing a mono-exponential fit to the signal decay curve of the hyperpolarized compound. Following complete decay of the hyperpolarized signal, a thermal spectrum of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate doped with Gadolinium was acquired with nearly identical parameters using a 90° flip angle and a repetition time of 1500ms. The level of polarization in solution was calculated by comparing the first hyperpolarized spectrum with its corresponding thermal spectrum, correcting for flip angle and number of scans. The amplitude of the hyperpolarized signal was also corrected for T₁ relaxation during the transfer time from the polarizer to the spectrometer (12 s).

Animals. All experiments were performed on young adult male Sprague Dawley OFA rats weighing 180–200 g at first surgery time and were in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Protocols were conformed to the ethical guidelines of the French Ministry of Agriculture and Forests and were approved by the local ethical committee (CE08-11). Animals were housed four per cage and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle at a

constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food and water. Eighteen rats were utilized, divided up into two groups. 8 rats were used to validate *ex vivo* the blood brain barrier (BBB) disruption ($n=4$) with an intracarotid NaCl 0.9% injection and $n=4$ with intracarotid injection of a hypertonic solution of 25% mannitol). The others were used for *in vivo* ^{13}C MR studies ($n=5$ with an intracarotid NaCl + hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate injections and $n=5$ with intracarotid mannitol + hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate injections).

Anesthesia and surgery. For surgical procedures, rats were anesthetized with 2-2.5% isoflurane in air and oxygen ($1.0\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 70% air and 30% oxygen). One catheter was secured in the femoral vein for IV injection of propofol (Propofol-Lipuro 1%, 10mg/mL, B. Braun, Medical SAS). Another catheter was secured in the right carotid artery for infusion of the hypertonic solution of 25% mannitol or NaCl 0.9% (infusion rate: $0.25\text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 30s). The external carotid was ligated to maximize the delivery of mannitol toward the brain. Then, isoflurane anesthesia was shifted to propofol anesthesia, $1.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ under 100% O_2 for all the remainder of the experimentation.

Blood Brain Barrier (BBB) Disruption. Prior to delivery mannitol solution was heated to 37°C and filtered using a 0.45mm-diameter filter in order to prevent micro-infarcts due to the possible presence of crystals.

To validate *ex vivo* BBB disruption, 5 minutes after mannitol or NaCl 0.9%, animals received intracarotid Evans blue injection ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Then, rats were killed. Brains were removed and extracted in formamide. Evans blue dye in the infused hemi-brain was measured using spectrophotometry at 620nm.

In order to validate the hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate detection inside the rat brain, 4 rats were used and separated in 2 groups. 2 rats received mannitol and 5 minutes after the hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate. The other rats received NaCl 0.9% following by hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate. Intracarotid injection of hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate began within 12s after dissolution. A volume of 0.2ml of the hyperpolarized solution was injected over 10s. ^{13}C 2D dynamic chemical shift imaging (CSI) was acquired starting at the beginning of the hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate injection from a 20 mm slab including the whole brain using the spectral-spatial (SPSP) scheme as described by Schulte et al. (2013)(Schulte et al. 2013). The scheme used a specialized multi-band SPSP RF excitation pulse designed to provide a 15 degree FA for hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glutamate and 90 degree FA for lactate, a repetition time of 1000 ms and number of scans (NS) = 64. Excitation frequencies were centered on C_1 glutamate and lactate. After spectral and slice selective excitation of a single metabolite, the image was encoded with a single-shot spiral readout.

***In vivo* MR protocol.** All measurements were performed using the 3T MR750 Scanner. Animals under propofol anesthesia were secured in a handling system with head centered in the coil. Respiratory rate was monitored all along the session to adjust anesthesia and corporal temperature was maintained at 37.8°C using a warm air system.

Anatomical imaging was performed to assess brain location (3D T1-weighted sequence, TE/TR=3.9/8.800 ms, field of view=40mm, matrix 160x160, thickness=1.6 mm, acquisition time 7 min 40 s). For ^{13}C acquisitions, flip angle (FA) and frequency calibration was performed on a 0.5 ml tube of 3M [1- ^{13}C] lactate placed close to the head.

To observe to metabolism of hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate inside the rat brain, dynamic ^{13}C MR spectra were acquired from a 15 mm slab including the brain on 3 rats injected with mannitol 25% and 3 rats injected with NaCl 0.9%. Data acquisitions started 7s after the beginning of the hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate injection. Spectra were acquired using a whole volume ^{13}C acquisition sequence (FOV = 40mm; TR = 1000ms; NS = 20; sw = 4000Hz). It used a small FA of 15 degree to preserve substrate magnetization.

For all *in vivo* studies, B_0 shimming was performed manually. The linewidth of [1- ^{13}C] glutamate was in mean 30 Hz for the 1D and 2D MRS experiments.

***In vivo* MR data analysis.** For *in vivo* 2D CSI experiments, ^{13}C data sets were post-processed using a routine implemented in Matlab (MathWorks, Natick, MA) as described by Schulte group^{33 31}. Briefly, the integrals of hyperpolarized [1- ^{13}C] lactate and hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate were calculated. Superimposing the 2D ^{13}C CSI data onto the axial T₁-weighted images was performed to localize the brain voxels. Color heatmaps of hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate were generated at the start of injection by spatial interpolation of the 2D ^{13}C CSI data to the anatomical image resolution.

For *in vivo* slab dynamic experiments, integrals of hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate, [1- ^{13}C] glutamine and [5- ^{13}C] glutamate and integral of [1- ^{13}C] lactate phantom were quantified by peak integration of the dynamic hyperpolarized ^{13}C spectra using jMRUI software and the AMARES algorithm (version 5.0, <http://www.mrui.uab.es/mrui>).

***In vitro* phantom MR protocol.** For reference purposes, a high-resolution ^{13}C NMR spectrum was acquired from a mixture of 10mM of glutamate and 10mM of glutamine (25 °C, pH 7.2).

High-resolution ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum was obtained at 9.7 T using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany), using a 5-mm probe. The acquisition conditions were 90°

pulses; 22 kHz spectral width; 1.49 s acquisition time; 16,000 data points; 2,048 transients; and 6 s recycling time. A WALTZ-16 composite pulse-decoupling sequence was applied just during the acquisition time to avoid the nuclear Overhauser effect. Data were zero-filled twice and multiplied by an exponential function before Fourier transformation.

Post-mortem analysis. To validate that the carotid occlusion had induced no brain infarct during the time of animal installation and NMR *in vivo* acquisition (30 minutes), the procedure of 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used³⁴. At the end of the hyperpolarized ¹³C MR experiment, animals were killed by decapitation under deep anesthesia. The brains were quickly isolated, placed in the cold (0–4°C) PBS-filled trough of the brain matrix and sectioned into serial 2-mm-thick coronal slices. Isolation and slicing of the brain was completed within 10 min from the time the rat was decapitated. The brain slices were held in PBS (< 3 min) at room temperature till they are transferred to 0.05% TTC incubation medium for 30 minutes at 37°C.

TTC solutions in PBS stained normal viable brain tissue in shades of red, while the infarcted tissue remained unstained. Color images of the slices were obtained by directly observing the slices. Color was assessed qualitatively.

Results

[1-¹³C] glutamate DNP. After 90 min polarization, [1-¹³C] glutamate reached a solid-state polarization of 20±2.3%. Following dissolution in a buffered solution (pH=7.4), liquid state polarization measured at 37°C was 13±1.5% (n=3). The resonances of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate ($\delta_{C1-Glu} = 175.4$ ppm) and [5-¹³C] glutamate ($\delta_{C5-Glu} = 182.2$ ppm) originating from the 1.1% natural abundance ¹³C were detected in *in vitro* spectra (Fig. 1). *In vitro* measured T₁ relaxation of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate measured at 3T was 30±2.5s (n=3).

BBB opening. After brain extraction, mannitol-induced BBB disruption was visible by Evans blue coloration on the side of injection (data not shown).

In order to evaluate BBB disruption, spectrophotometry at 620nm on brain extract was used to estimate the average Evans blue extravasation per unit mass (mg/g tissue). The results showed increased Evans blue concentration inside the hemisphere ipsilateral to injection in rats treated with mannitol 25% compared to control group injected with NaCl 0.9% (11.12±2.33 vs 3.96±0.38; **p<0,01) (Fig. 2). Thus, an increase of 44% of Evans blue extravasation after BBB opening by mannitol 25% was observed in the hemisphere ipsilateral to the injection site.

We also observed a significant difference of Evans blue concentration in the ipsilateral hemisphere compared to the contralateral hemisphere in mannitol treated rats (11.12 ± 2.33 vs 5.41 ± 1.55 ; $*p < 0.05$) (Fig.2). No significant difference was observed between hemispheres in control group treated with NaCl 0.9% (3.96 ± 0.38 vs 3.10 ± 0.77 ; NS) (Figure).

Vizualization of [1-¹³C] glutamate *in vivo* inside the brain. Then, we examined the spatial distribution of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate using the dedicated SPSP sequence³¹. Mannitol 25% or NaCl 0.9% was infused in the right carotid and 5 minutes after, hyperpolarized [1-¹³C] glutamate was injected via the same route. NMR data were acquired every 3s from the beginning of the hyperpolarized substrate injection. ¹³C magnetic resonance imaging acquired after injection of 38mM solution of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate showed its signal inside the right part of the rat head at 2s after injection (Fig. 3a). Animals under BBB disruption protocol (with mannitol 25%) allowed the detection of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate in the brain at 5s contrary to the control group injected with NaCl 0.9% (Fig. 3a)

Thus, in order to optimize the hyperpolarized [1-¹³C] glutamate visualization in the next acquisitions, the hyperpolarized [1-¹³C] glutamate signal detection was fixed to start at 7s.

The Glu images collected of hyperpolarized substrate injection for a rat under BBB disruption protocol showed that Glu signal was quickly observed in the brain for 7s after the bolus (Fig. 3b). At a delay of 10s, elevated Glu signal was also observed in the sagittal sinus vein at the top of the images. The Glu signal was present inside the brain up to the 15th second acquisition.

In a second step of experiments, dynamic ¹³C spectra were acquired every second from an axial slab including the whole brain of the rat. Five minutes after BBB disruption with mannitol, hyperpolarized [1-¹³C] glutamate was injected into the carotid artery and NMR acquisitions started 7s after the Glu bolus. Hyperpolarized [1-¹³C] glutamate signal was observed and a resonance at 174.9ppm was detected (Fig. 4a and 4b). Given the delay of appearance of this last peak, the well-known metabolism of Glu and the chemical shifts defined from the ¹³C *in vitro* spectrum of the Glu-Gln mixture (Fig. 4c), the 174.9 resonance corresponds to the [1-¹³C] glutamine.

Fig. 5 represents a graph of signal evolution of the metabolites course after BBB disruption and bolus injection of hyperpolarized [1-¹³C] glutamate into the carotid artery. Curves were the mean \pm s.e.m. for 3 rats. The first points were taken 7s after the beginning of the bolus injection and were approximately 20s after the dissolution of hyperpolarized Glu. The Glu signal peaked 7s after the start of acquisitions. The decrease in Glu signal due to T₁ relaxation and metabolic conversion was accompanied by an increase in the [1-¹³C] glutamine signal, which peaked 2s after Glu (Fig. 5). The

[1-¹³C] lactate signal corresponded to the phantom used for frequency and flip angle calibration and was stable over time.

Due to the time between carotid occlusion and ¹³C NMR acquisitions linked to animal installation in the handling system, NMR calibrations and NMR images acquisitions (30 minutes in mean), it was necessary to control that carotid ligature had induced any brain ischemia during this time. All rat brains isolated at the end of NMR acquisition and incubated in the TTC solution were fully colored in red indicating that there was no cerebral ischemia at the time of experiment (data not shown).


Discussion

Our study shows for the first time the possibility to follow the Glu-Gln cycle in real-time in the rat brain by the use of DNP coupled with ¹³C MRS. By implementing a BBB disruption protocol, this work extends the feasibility of studied brain metabolism for a new range of precursors.

As previously describes³², we successfully achieved a polarization level and a T₁ relaxation of [1-¹³C] Glu compatible with its detection *in vivo*. As Glu has a low solubility in water, caution was taken when preparing the sample in order to maximize the sample homogeneity before cooling into the polarizer to obtain higher polarization rate¹⁴. Dissolution step at high pressure and temperature leads to a fully dissolved sample that can be injected in animals.

However, targeting the central nervous system is limited by the ability of agents to gain access to brain³³. Indeed, uptake of glutamate from the circulation is limited by the blood-brain barrier³⁴. Improvement of hyperpolarized Glu delivery was done with an agent widely used for BBB disruption: mannitol. Indeed, hypertonic injection of mannitol induced the rupture of tight junctions between endothelial cells at the BBB³³. The BBB permeability obtained is transient and reversed within the 10min after mannitol injection³³.

In animals BBB disruption protocol requires the precise choice of injection rate and anesthetic agent^{33 35 36 37}. Especially, anesthesia under isoflurane leads to a poor BBB permeability compared to propofol anesthesia³⁸. In the present study, transient BBB disruption was obtained after intracarotid infusion of mannitol 25% at 0.25 ml.s⁻¹.kg⁻¹ under propofol anesthesia. This dose was choosing to be the more effective without significant neuronal damages³⁹. Evaluation of BBB permeability was done using Evans blue extravasation. Indeed, Evans blue allows the visual assessment^{37 38} and spectrophotometric measurement^{40 41} of BBB integrity as it does not cross an intact BBB due to its binding to serum albumin. With our MRI equipment, when the rat is placed inside the scanner,



classical injection inside the internal carotid cannot be achievable due to the impossibility to close transitory the carotid artery so that mannitol flow reach the brain⁴². Thus, as previously describes, we choose to place the cannula for the injection of mannitol and Glu directly inside the main carotid artery⁴³ after ligate its proximal ending. As NMR experiment takes around 30min, ischemia assessment was done after brain removal by using TTC labeling⁴⁴. Indeed, TTC generate a red compound when metabolized into mitochondria and thus reflecting the cell viability. Brains were fully colored in red indicating that there was no cerebral ischemia at the time of experiment. This could be explained by the large anastomosis of the main brain arteries in rat⁴⁵ combined with the short time between carotid ligation and experiment.

Thus, by this methodological development, we showed for the first time that the injection of hyperpolarized [1-¹³C] Glu within the BBB disruption window leads to its appearance inside the rat brain contrary to control group injected with NaCl. The modified version of the SPSP sequence³¹ for an optimized Glu detection allowed the follow of Glu appearance inside the rat brain. However, this sequence cannot enable to distinguish Glu and Gln resonance so as the chemical shift between Glu and Gln in labeled in C1 is only 0.5ppm.

Nevertheless, ¹³C NMR experiments using a slice covering the rat head showed that after hyperpolarized [1-¹³C] Glu injection, the signal of one metabolite could also be seen. Indeed, we have detected the appearance of a signal at around 0.5ppm from [1-¹³C] Glu. This chemical shift corresponds to the [1-¹³C] Gln as identified by high resolution MRS experiment. However, due to the low spectral resolution obtained at 3T, Gln peak is located neighboring to Glu. Works at higher magnetic field could allow a better distinction of the 2 metabolites.

Previous work realized *in vitro* and *in vivo* on liver showed the appearance of AKG after injection of hyperpolarized [1-¹³C] Glu due to the energetic fate of Glu in this organ. In the brain, Glu metabolism is compartmentalized between neurons and astrocytes⁴⁶. Indeed, Glu is mainly converted into Gln by the action of glutamine synthase (GS) in astrocytes² whereas deamidation of glutamine into glutamate primarily take places in neurons. In our work, we showed here that exogenous Glu is mainly metabolized as Gln in the brain in our conditions and thus, reflects essentially the glial metabolism of Glu by the GS. If Glu is mainly converted as Gln at low concentration, it was reported that increased in exogenous Glu concentration leads to the preferential Glu metabolism by the TCA cycle into AKG⁴⁷. However, only signal from [1-¹³C] Gln has been observed in our study. This suggests that in our conditions Glu may remains at low concentration in the brain of animals and thus leads to the predominant synthesis of Gln. In addition, contrary to the cytoplasmic GS⁴⁸, conversion of Glu into AKG is achieved by the glutamate deshydrogenase (GDH) inside mitochondria matrix⁴⁹. Thus, the

absence of AKG signal within the time of hyperpolarized experiment could also be explained by the slow transport of $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate into mitochondria. Also, we showed that although, hyperpolarized Glu was suggested to be used as precursor to follow AKG levels for probing glioma status⁵⁰ the absence of AKG signal in our study suggest that Glu is not a relevant metabolite to follow this reaction in the brain. Indeed, even if injection of higher Glu concentration should leading to the appearance of AKG, it would be toxic for animals³². In line with this, recently, AKG itself was shown to be a more relevant probe to assess the glioma status *in vivo*^{17,18}.

Compared to conventional ^{13}C NMR experiment, DNP allowed the follow in real time of Glu metabolism. Indeed, even at higher magnetic fields, temporal resolution of ^{13}C NMR experiment stay around 4.5min at 14.1T⁹. DNP allowed to reduce the temporal resolution to few seconds and thus in our study to visualize in real-time the Gln synthesis. This direct detection could be useful in order to identify changes in the enzymatic activity in the context of brain diseases. Such as the assessment of pyruvate to lactate ratio in tumors compared to normal tissue²⁴, assessment of Glu to Gln synthesis rate would offer a new diagnostic tool for neurodegenerative diseases.

In this study, we showed for the first time a new way to follow the Glu-Gln cycle *in vivo* in real-time. Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ Glu would be a promising substrate for evaluation of Glu-Gln cycle activity in conjunction with neurodegenerative diseases. Moreover, by the use of previous infusion of hyperosmolar agent we demonstrate the feasibility of probing various hyperpolarized compound inside the brain.

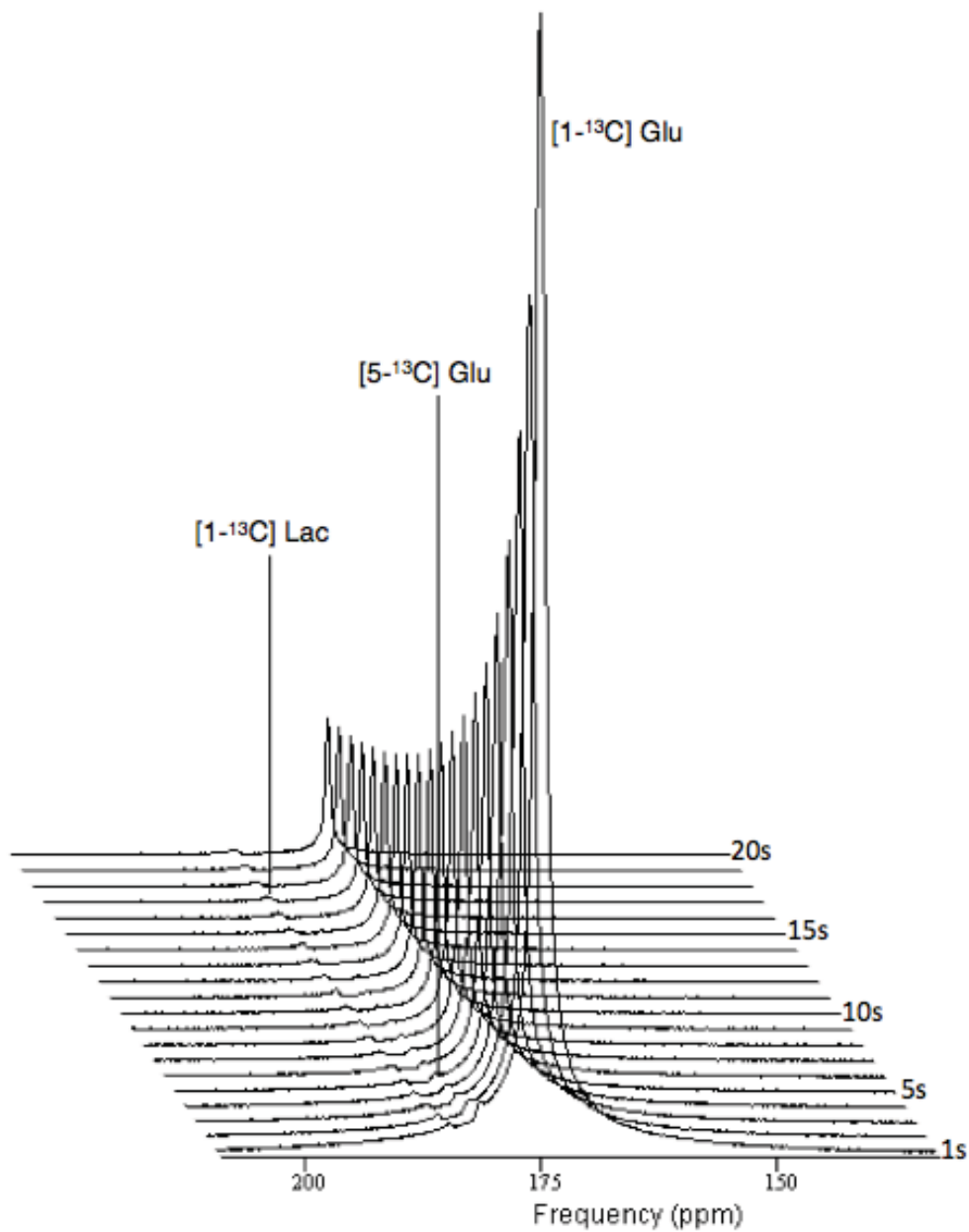


Figure 1 Representative spectra of in vitro hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate. Stack plot of ^{13}C spectra of hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate in solution acquired at 3T shows the decay of the hyperpolarized signal (TR 1s, flip angle 5°). The resonance of hyperpolarized [1- ^{13}C] glutamate (175.4ppm) and [5- ^{13}C] glutamate (182,2ppm) are assigned. The signal at 184ppm comes from the [1- ^{13}C] lactate reference.

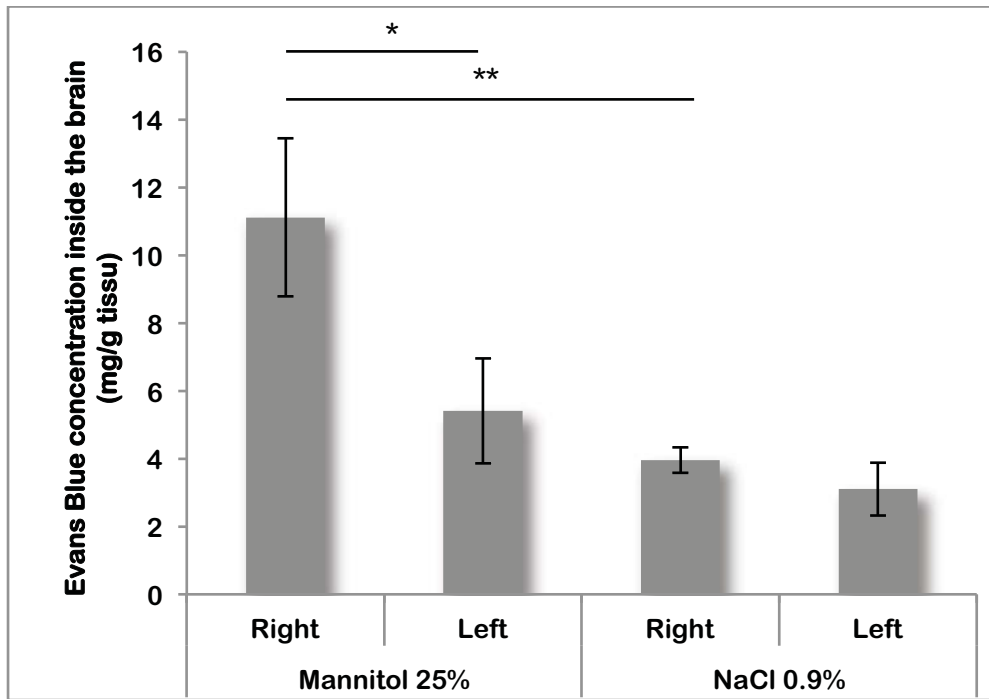
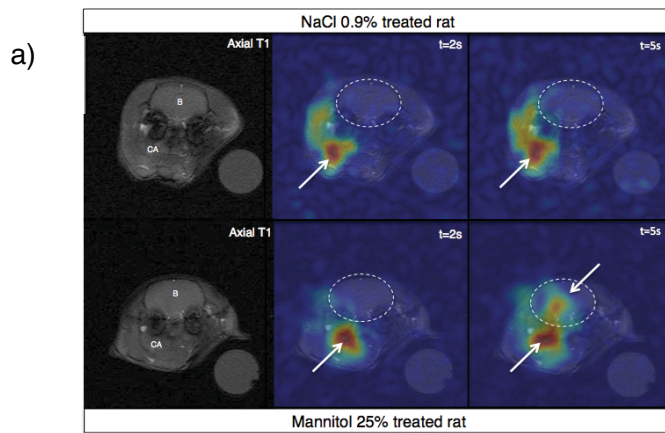


Figure 2 Assessment of BBB opening after hyperosmolar injection of mannitol 25%. Spectrophotometry at 620nm reveals a significant increase of Evans blue staining in the ipsilateral hemisphere after mannitol 25% injection compared with NaCl 0.09% injection (** $p < 0.01$). The Evans blue concentration is significantly higher in the side of mannitol injection than in the contralateral side (* $p < 0.05$). Results were expressed as mean \pm sem. Statistical was tested using Statistica v7.1 (Stat Soft, Maisons-Alfort, France) with a Student's t-test.



b)

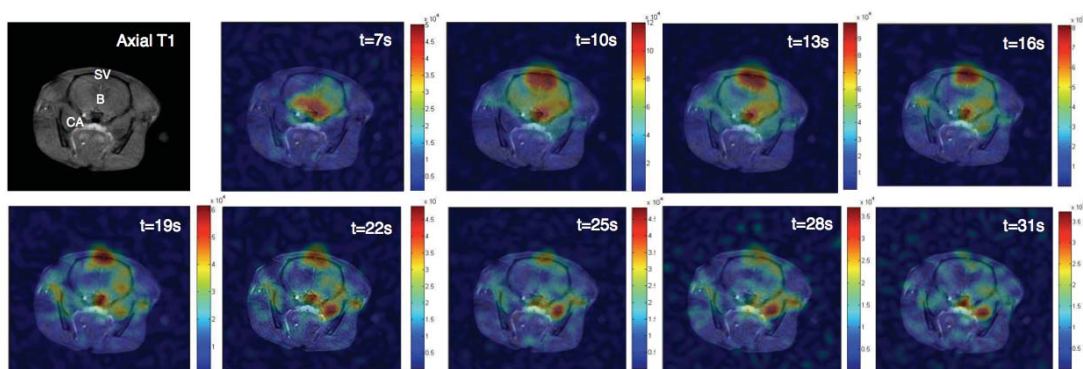


Figure 3 *In vivo* detection of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate inside the rat brain. Signal acquisition was done using the SPSP sequence centered on the $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate frequency (TR 3s; flip angle 15°). a) Axial T_1 -weighted images of rat brain (CA= Carotid Artery, B= Brain). Hyperpolarized signal of $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate (white arrow) can be seen inside the rat head after NaCl 0.9% injection in the right carotid artery (CA). Hyperpolarized signal of $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate (white arrows) was observed in the brain (white dotted circle) only after mannitol 25% infusion. b) Axial T_1 -weighted images of rat brain (CA= Carotid Artery, B= Brain, SV= Sagittal Vein). Time evolution of the hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate signal inside the rat brain. First acquisition was done at 7s post-injection. ^{13}C images were surimposed on the T_1 -weighted images, which were acquired at the beginning of the experiment.

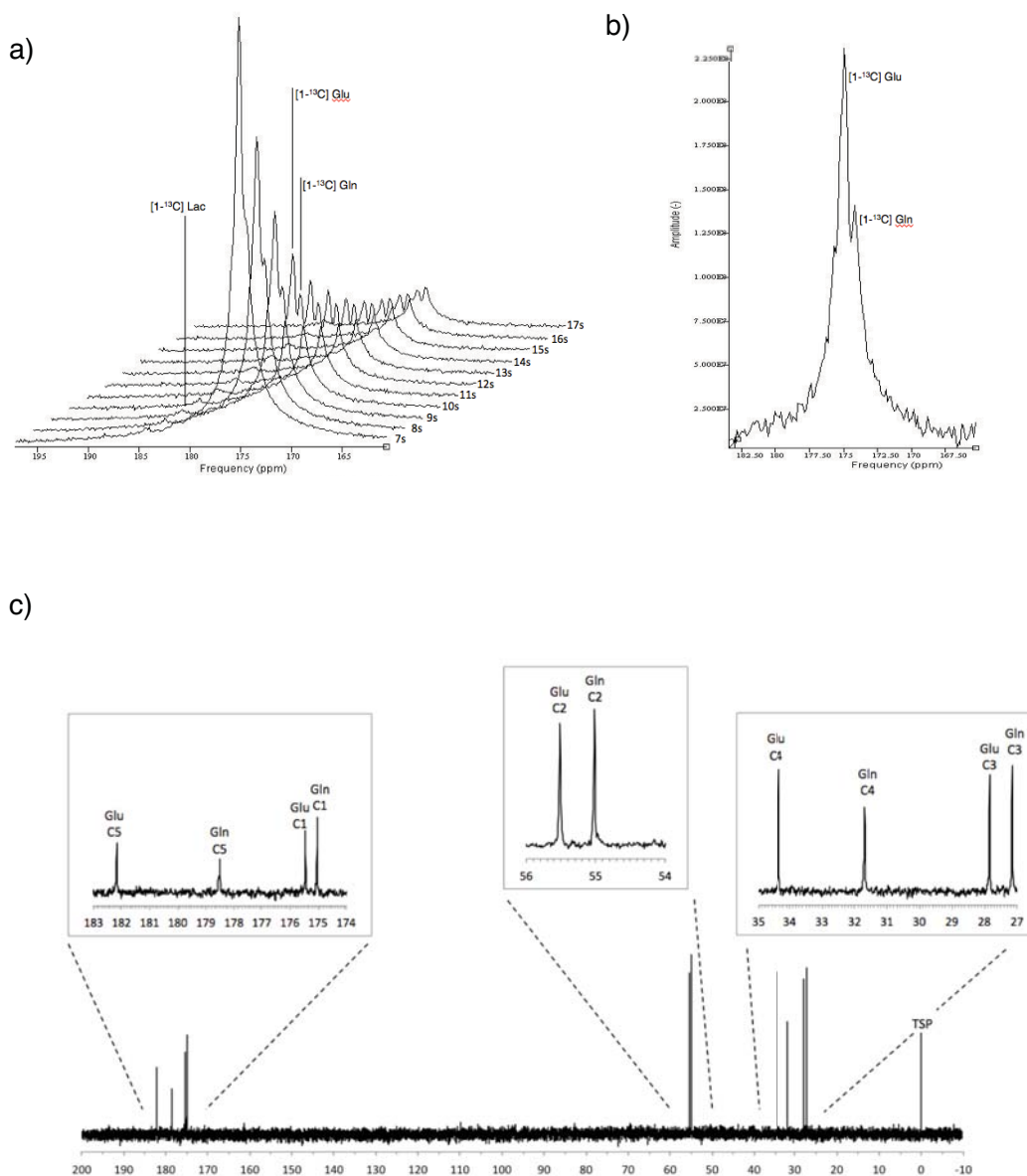


Figure 4. $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate and $[1-^{13}\text{C}]$ glutamine can be detected *in vivo* after BBB opening. a) Stack representation of the 10 first spectra acquired 7s after the hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate injection on a slice covering the rat brain (TR 1s; flip angle 15°). Reference signal from $[1-^{13}\text{C}]$ lactate (Lac) can be seen at 185ppm. *In vivo*, the resonance at 175.4ppm is from $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate and $[1-^{13}\text{C}]$ glutamine peak can be seen at 174.9ppm. **b)** Sum of the first 10 spectra acquired 7s after hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ glutamate injection. **c)** *In vitro* ^{13}C NMR spectrum of a mixture of glutamate and glutamine. Signals of each natural abundance carbon of glutamate and glutamine are detectable and chemical shifts are respectively: $\delta\text{C1-Glu} = 175.4\text{ppm}$, $\delta\text{C2-Glu} = 55.5\text{ppm}$, $\delta\text{C3-Glu} = 27.9\text{ppm}$, $\delta\text{C4-Glu} = 34.4\text{ppm}$, $\delta\text{C5-Glu} = 182.1\text{ppm}$ and $\delta\text{C1-Gln} = 174.9\text{ppm}$, $\delta\text{C2-Gln} = 55.0\text{ppm}$, $\delta\text{C3-Gln} = 27.0\text{ppm}$, $\delta\text{C4-Gln} = 31.3\text{ppm}$, $\delta\text{C5-Gln} = 178.5\text{ppm}$. TSP is the internal reference ($\delta\text{TSP} = 0\text{ppm}$). Chemical shifts defined from *in vivo* spectra are in agreement with those obtained *in vitro*.

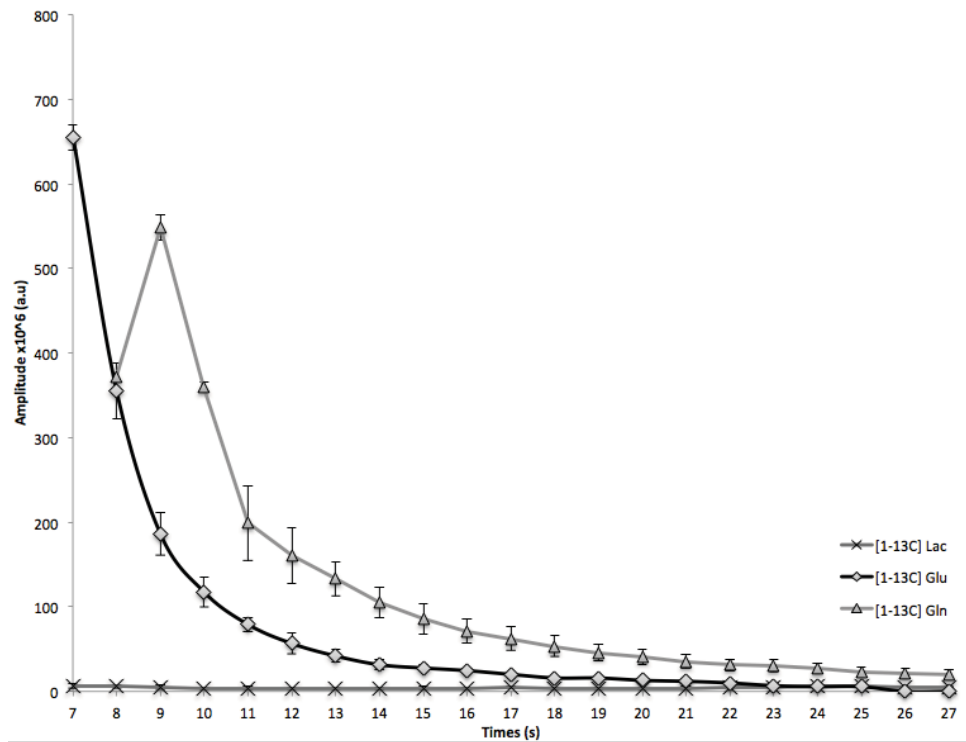


Figure 5 Time evolution of hyperpolarized signals *in vivo*. Signal amplitudes are measured from dynamic ¹³C spectra acquired on the rat head 7s after hyperpolarized [1-¹³C] glutamate for 3 rats that underwent the BBB disruption protocol. Curves represent averaged amplitudes of hyperpolarized signals of [1-¹³C] glutamate; [1-¹³C] glutamine and [1-¹³C] lactate. Bars are the sem.

Bibliography

- 1- Paxinos, G. The rat nervous system. (2004).
- 2- Martinez-Hernandez, A., Bell, K. & Norenberg, M. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* (80). 195, 1356–8 (1977).
- 3- Ramadan, S., Lin, A. & Stanwell, P. Glutamate and glutamine : a review of *in vivo* MRS in the human brain. *NMR Biomed.* 26, 1630–1646 (2013).
- 4- Chassain, C. et al. Cerebral glutamate metabolism in Parkinson ' s disease : an *in vivo* dynamic C NMS study in the rat. *Exp. Neurol.* 191, 276–284 (2005).
- 5- Chassain, C., Bielicki, G., Keller, C., Renou, J.-P. & Durif, F. Metabolic changes detected *in vivo* by 1H MRS in the MPTP-intoxicated mouse. *NMR Biomed.* 23, 547–53 (2010).
- 6- Rupsingh, R., Borrie, M., Smith, M., Wells, J. L. & Bartha, R. Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease &. *Neurobiol. Aging* 32, 802–810 (2011).
- 7- Sibson, N. R. et al. *In vivo* 13C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2699–704 (1997).
- 8- Duarte, JM; Gruetter, R. Glutamatergic and GABAergic energy metabolism measured in the rat brain by (13) C NMR spectroscopy at 14.1 T. *Neurochem. J. O F* 126, 579–590 (2013).
- 9- Lanz B, Xin L, Millet P, G. R. *In vivo* quantification of neuro-glial metabolism and glial glutamate concentration using 1H-[13C] MRS at 14.1T. *Neurochem. J. O F* 128, 125–139 (2014).
- 10- Lanz, B., Gruetter, R. & Duarte, J. M. N. Metabolic flux and compartmentation analysis in the brain *in vivo*. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 1–18 (2013).
- 11- Ardenkjaer-Larsen, J. H. et al. Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10158–63 (2003).
- 12- Golman, K., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Petersson, J. S., Mansson, S. & Leunbach, I. Molecular imaging with endogenous substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10435–9 (2003).
- 13- Golman, K., in 't Zandt, R. & Thaning, M. Real-time metabolic imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11270–5 (2006).

-
- 14-** Karlsson, M., Jensen, P., Duus, J. Ø., Meier, S. & Lerche, M. H. Development of Dissolution DNP-MR Substrates for Metabolic Research. *Appl. Magn. Reson.* (2012). doi:10.1007/s00723-012-0336-7
- 15-** Day, S. E. et al. Detecting response of rat C6 glioma tumors to radiotherapy using hyperpolarized [1-(13)C]pyruvate and (13)C magnetic resonance spectroscopic imaging. *Magn. Reson. Med.* 563, 557–563 (2010).
- 16-** Park, I. et al. Detection of Early Response to Temozolomide Treatment in Brain Tumors Using Hyperpolarized C MR Metabolic Imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* 1290, 1284–1290 (2011).
- 17-** Chaumeil, M. M. et al. Non-invasive *in vivo* assessment of IDH1 mutational status in glioma. *Nat. Commun.* 4, 1–12 (2013).
- 18-** Chaumeil, M. M., Larson, P. E. Z. & Woods, S. M. Hyperpolarized [1- 13 C] glutamate : a metabolic imaging biomarker of IDH1 mutational status in glioma. *Cancer Res.* DOI: 10.1158/0008–5472.CAN–14–0680 (2014). doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0680
- 19-** Nelson, S. et al. Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [1-13C]pyruvate. *Sci. Transl. Med.* 5, (2013).
- 20-** Hurd, R. E. et al. Cerebral dynamics and metabolism of hyperpolarized [1-(13)C]pyruvate using time-resolved MR spectroscopic imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 1734–41 (2010).
- 21-** Marjańska, M. et al. *In vivo*(13)C spectroscopy in the rat brain using hyperpolarized [1-(13)C]pyruvate and [2-(13)C]pyruvate. *J. Magn. Reson.* 206, 210–218 (2010).-
- 22-** Mayer, D. et al. *In vivo* application of sub-second spiral chemical shift imaging (CSI) to hyperpolarized 13C metabolic imaging: comparison with phase-encoded CSI. *J. Magn. Reson.* 204, 340–5 (2010).
- 23-** Park, I. et al. Dynamic Hyperpolarized Carbon-13 MR Metabolic Imaging of Nonhuman Primate Brain. *Magn. Reson. Med.* 71, 19–25 (2014).
- 24-** Park, J. M. et al. Metabolic response of glioma to dichloroacetate measured *in vivo* by spectroscopic imaging. *Neuro. Oncol.* 15, 433–441 (2013).
- 25-** Park, I. et al. Evaluation of Heterogeneous Metabolic Profile in an Orthotopic Human Glioblastoma Xenograft Model Using Compressed Sensing Hyperpolarized 3D 13 C Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. *Magn. Reson. Med.* 70, 33–9 (2013).

- 26-** Chaumeil, M. M. et al. NeuroImage 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 (2012).
- 27-** Park, I. et al. Detection of Early Response to Temozolomide Treatment in Brain Tumors Using Hyperpolarized ¹³C MR Metabolic Imaging. J. Magn. Reson. Imaging 1290, 1284–1290 (2011).
- 28-** Mishkovsky, M., Comment, A. & Gruetter, R. *In vivo* detection of brain Krebs cycle intermediate by hyperpolarized magnetic resonance. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 2108–2113 (2012).
- 29-** Park, J. M. et al. Measuring mitochondrial metabolism in rat brain *in vivo* using MR Spectroscopy of hyperpolarized [²⁻¹³C] pyruvate. NMR Biomed. 26, 1197–1203 (2013).
- 30-** Butt, S. a et al. Imaging cerebral 2-ketoisocaproate metabolism with hyperpolarized (¹³C) Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1–7 (2012). doi:10.1038/jcbfm.2012.34
- 31-** Schulte, R. F. et al. Saturation-Recovery Metabolic-Exchange Rate Imaging with Hyperpolarized [¹⁻¹³C] Pyruvate Using Spectral-Spatial Excitation. Magn. Reson. Med. 69, 1209–1216 (2013).
- 32-** Gallagher, F. et al. Detection of tumor glutamate metabolism *in vivo* using (¹³C) magnetic resonance spectroscopy and hyperpolarized [¹⁻⁽¹³C)]glutamate. Magn. Reson. Med. 66, 18–23 (2011).
- 33-** Wiesinger, F. et al. IDEAL Spiral CSI for Dynamic Metabolic MR Imaging of Hyperpolarized [¹⁻¹³C] Pyruvate. Magn. Reson. Med. 68, 8–16 (2012).
- 34-** Bederson, J. et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke 17, 1304–8 (1986).
- 35-** Sl., R. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. Cell. Mol. Neurobiol. 20, 217–30 (2000).
- 36-** Chi OZ, Chun TW, Liu X, W. H. The effects of pentobarbital on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. Anesth. Analg. 86, 1230–5 (1998).
- 37-** Chi, Oak Za ; Lee, Doo Ik; Liu, Xia ; Weiss, H. R. The Effects of Morphine on Blood-Brain Barrier Disruption Caused by Intracarotid Injection of Hyperosmolar Mannitol in Rats. Anesth. Analg. 90, 603–608 (2000).

- 38-** Blanchette M, F. D. Blood-brain barrier disruption in the treatment of brain tumors. *Methods Mol. Biol.* 686, 447–463 (2011).
- 39-** Remsen LG, Pagel MA, McCormick CI, Fiamengo SA, Sexton G, N. E. The influence of anesthetic choice, PaCO₂, and other factors on osmotic blood-brain barrier disruption in rats with brain tumor xenografts. *Anesth. Analg.* 88, 559–67 (1999).
- 40-** Cosolo WC, Martinello P, Louis WJ, C. N. Blood-brain barrier disruption using mannitol: time course and electron microscopy studies. *Am. J. Physiol.* 256, 443–7 (1989).
- 41-** Nicaise C, Mitrecic D, Demetter P, De Decker R, Authelet M, Boom A, P. R. Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Res.* 1301, 152–162 (2009).
- 42-** Chen KB, Wei VC, Yen LF, Poon KS, Liu YC, Cheng KS, Chang CS, L. T. Intravenous mannitol does not increase blood-brain barrier permeability to inert dyes in the adult rat forebrain. *Neuroreport* 24, 303–7 (2013).
- 43-** Hsieh, C. et al. Evaluation of Pharmacokinetics of 4-Borono-2-¹⁸F-Fluoro- L -Phenylalanine for Boron Neutron Capture Therapy in a Glioma-Bearing Rat Model with Hyperosmolar Blood – Brain Barrier Disruption. *J. Nucl. Med.* 46, 1858–1865 (2005).
- 44-** Muldoon, L. L. et al. A Physiological Barrier Distal to the Anatomic Blood- Brain Barrier in a Model of Transvascular Delivery. *Am. J. Neuroradiol.* 20, 217–222 (1999).
- 45-** Chen, Jun; Zhang, F. *Animal Models of Acute Neurological Injuries II.* 93–96 (2012).
- 46-** Kitagawa, K. et al. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 570–9 (1998).
- 47-** Patel, A., Hunt, A., Gordon, R. & Balazs, R. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation glutamate. *Brain Res.* 256, 3–11 (1982).
- 48-** Mckenna, M. C. Review The Glutamate-Glutamine Cycle Is Not Stoichiometric : Fates of Glutamate in Brain. *J. Neurosci. Res.* 3358, 3347–3358 (2007).
- 49-** Cairns, B. E. et al. Systemic administration of monosodium glutamate elevates intramuscular glutamate levels and sensitizes rat masseter muscle afferent fibers. *Pain* 132, 33–41 (2007).



*Conclusions et
perspectives*

La RMN est une technique non invasive d'analyse structurale et métabolique d'un tissu. Dans ce projet de thèse, deux approches de la RMN ont été proposées afin de répondre à une problématique centrale à savoir l'évaluation du métabolisme glutamatergique dans le cerveau parkinsonien. La première visait à appliquer la spectroscopie RMN du proton ^1H chez l'homme afin d'explorer et caractériser la biochimie du putamen chez le patient parkinsonien à jeun de traitement et d'apprécier son évolution après traitement. La deuxième approche consistait au développement de la spectroscopie RMN du carbone ^{13}C hyperpolarisé pour l'étude dynamique du métabolisme cérébral et en particulier ce métabolisme glutamatergique chez un modèle animal de la maladie de Parkinson.

Dans l'étude clinique menée chez les patients parkinsoniens, la SRM du ^1H nous a permis d'identifier des modifications du métabolisme cérébral dans le putamen. Il a notamment été observé une diminution du métabolisme énergétique qui est restaurée par la prise de L-dopa. Si les concentrations en glutamate et glutamine ne semblent pas varier chez notre groupe de patients, nous avons cependant observé une baisse significative de la concentration en M-Ins qui pourrait refléter une augmentation passée des taux de glutamate et glutamine dans le cerveau comme cela a été montrée dans l'hépto-encéphalopathie. En effet, des phénomènes d'adaptation liés à l'évolution de la maladie et/ou aux traitements dopaminergiques mis en place pourraient masquer cette augmentation de glutamate, glutamine décrite chez les modèles animaux. Chez ces derniers, la dénervation dopaminergique est induite par une neurotoxine, elle est effective d'emblée et massive, de plus les animaux sont naïfs de traitement dopaminergique au moment des évaluations. Lorsque l'effet d'un traitement est évalué, il s'agit souvent d'une mesure réalisée après l'administration aigue de la molécule (Chassain et al. 2010, Bagga et al. 2013).

Ainsi la réalisation de cette étude sur une nouvelle cohorte de patients *de novo* diagnostiqués pour une maladie de Parkinson et n'ayant jamais reçu de traitement dopaminergique pourrait être réalisée afin d'évaluer le métabolisme en condition basale chez ces patients. En effet, le traitement dopaminergique peut entraîner une adaptation métabolique masquant les changements qui pourraient avoir lieu en début de maladie.

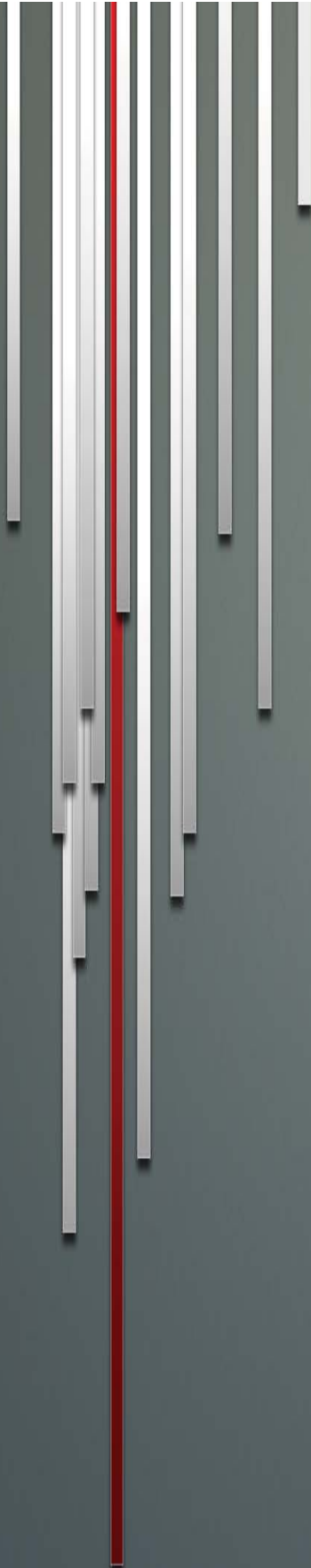
Ce premier travail s'inscrivant dans une thématique plus globale de l'équipe visant à étudier les troubles neuropsychiatriques de la maladie de Parkinson, il serait intéressant de suivre les modifications métaboliques dans différentes structures notamment dans le noyau accumbens, structure impliquée dans le circuit de la motivation et la récompense. En cela, une acquisition multi-

voxel grâce à une séquence FIDCSI permettrait une analyse complète des différentes structures impliquées dans la pathologie.

Dans la seconde étude de ce projet, nous avons développé une nouvelle technique de SRM pour l'étude du métabolisme cérébral. Si la SRM du ^{13}C a souvent été délaissée au profit d'autres techniques plus invasives en raison de son manque de sensibilité, nous montrons ici une nouvelle vision de son utilisation pour le suivi dynamique du métabolisme cérébral. Passant au delà des limitations induites par la BHE, nous avons montré dans ce projet la possibilité de suivre pour la première fois en temps réel la synthèse de glutamine suite à une injection de glutamate hyperpolarisé. Si ce travail n'a pu malheureusement qu'être réalisé que sur des animaux contrôlés au cours de cette thèse, il laisse entrevoir le potentiel de cette technique pour suivre les modifications du cycle glutamate-glutamine en condition pathologique. Ainsi le suivi des adaptations de ce cycle pourrait permettre de mieux comprendre ce mécanisme d'échange entre neurones et astrocytes dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Plusieurs perspectives pourraient permettre de développer les résultats obtenus au cours de ce second projet. En effet, si seule la glutamine est visible dans notre étude, une étude à plus haut champ magnétique pourrait peut-être permettre de visualiser d'autres métabolites comme le GABA ou encore de suivre l'incorporation du glutamate dans le cycle TCA. De plus, le développement actif de nouvelles stratégies innovantes d'acquisitions du signal accroît de jour en jour les capacités de détection du signal permettant encore d'augmenter la sensibilité de cette technique. Si pour de raisons de toxicité, l'hyperpolarisation du glutamate devra être cantonnée à des études précliniques, ces nouvelles stratégies pourraient permettre d'utiliser des précurseurs plus en amont du cycle mais moins nocifs comme l'AKG. L'association du protocole de rupture de la BHE couplée à la PDN ouvre ainsi la voie à l'administration de nouveaux marqueurs hyperpolarisés et de ce fait étend le champ d'analyse des voies métaboliques cérébrales par cette technique.

En conclusion, si la SRM du ^1H permet d'identifier des marqueurs caractéristiques de certaines pathologies, les informations limitées qu'elle apporte réduit son champ d'utilisation. La vision dynamique du métabolisme cérébral apportée par la PDN offre la clef qui pourra, sans doute dans un futur proche, libérer des informations importantes sur la compréhension des adaptations métaboliques qui sont contenues encore à l'heure actuelle dans cette fabuleuse boîte, le cerveau.



*Références
bibliographiques*

A

- Abbott, NJ, L Rönnbäck, and E Hansson. 2006. "Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier." *Nature Review Neurosciences* 7 (1): 41–53.
- Abe, K, H Terakawa, M Takanashi, Yoshiyuki Watanabe, Hisashi Tanaka, Norihiko Fujita, Norio Hirabuki, and Takehiko Yanagihara. 2000. "Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Patients with Parkinsonism." *Brain Res Bull* 52: 589–595.
- Abragam, A. 1955. "Overhauser Effect in Nonmetals." *Phys Rev* 98: 1729–35.
- Adams, Ralph W, Juan A Aguilar, Kevin D Atkinson, Michael J Cowley, Paul I P Elliott, Simon B Duckett, Gary G R Green, Iman G Khazal, Joaquín López-Serrano, and David C Williamson. 2009. "Reversible Interactions with Para-Hydrogen Enhance NMR Sensitivity by Polarization Transfer." *Science* 323 (5922): 1708–11.
- Albers, Mark J, Robert Bok, Albert P Chen, Charles H Cunningham, Matt L Zierhut, Vickie Yi Zhang, Susan J Kohler, et al. 2008. "Hyperpolarized ¹³C Lactate, Pyruvate, and Alanine: Noninvasive Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Grading." *Cancer Research* 68 (20): 8607–15.
- Andén, N E, A Dahlström, K Fuxe, and K Larsson. 1965. "Mapping out of Catecholamine and 5-Hydroxytryptamine Neurons Innervating the Telencephalon and Diencephalon." *Life Sciences* 4 (13): 1275–79.
- Andén, N E, K Hfuxe, B Hamberger, and T Hökfelt. 1966. "A Quantitative Study on the Nigro-Neostriatal Dopamine Neuron System in the Rat." *Acta Physiologica Scandinavica* 67 (3): 306–12.
- Anderson, Christofer M, and Raymond A. Swanson. 2000. "Astrocyte Glutamate Transport: Review of Properties, Regulation, and Physiological Functions." *Glia* 32: 1–14.
- Andres, R, A Ducray, U Schlattner, T Wallimann, and H Widmer. 2008. "Functions and Effects of Creatine in the Central Nervous System." *Brain Res Bull* 76: 329–43.
- Anglade, P, A Mouatt-Prigent, Y Agid, and E Hirsch. 1996. "Synaptic Plasticity in the Caudate Nucleus of Patients with Parkinson's Disease." *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration* 5 (2): 121–28.
- Ardenkjaer-Larsen, Jan H, Björn Fridlund, Andreas Gram, Georg Hansson, Lennart Hansson, Mathilde H Lerche, Rolf Servin, Mikkel Thaning, and Klaes Golman. 2003. "Increase in Signal-to-Noise Ratio of > 10,000 Times in Liquid-State NMR." *PNAS* 100 (18): 10158–63.
- Aryal, Muna, Costas D Arvanitis, Phillip M Alexander, and Nathan McDannold. 2014. "Ultrasound-Mediated Blood-Brain Barrier Disruption for Targeted Drug Delivery in the Central Nervous System." *Advanced Drug Delivery Reviews* 72: 94–109.
- Ascherio, Alberto, Honglei Chen, Marc G Weisskopf, Eilis O'Reilly, Marjorie L McCullough, Eugenia E Calle, Michael A Schwarzschild, and Michael J Thun. 2006. "Pesticide Exposure and Risk for Parkinson's Disease." *Annals of Neurology* 60 (2): 197–203.
- Aubert, I, I Ghorayeb, E Normand, and B Bloch. 2000. "Phenotypical Characterization of the Neurons Expressing the D1 and D2 Dopamine Receptors in the Monkey Striatum." *The Journal of Comparative Neurology* 418 (1): 22–32.

B

- Bagga, P, A Chugani, K Varadarajan, and A Patel. 2013. "In Vivo NMR Studies of Regional Cerebral Energetics in MPTP Model of Parkinson's Disease: Recovery of Cerebral Metabolism with Acute Levodopa Treatment." *J Neurochem* 127: 365–77.
- Bagga, Puneet, Anup N Chugani, Komanduri S Varadarajan, and Anant B Patel. 2013. "In Vivo NMR Studies of Regional Cerebral Energetics in MPTP Model of Parkinson's Disease: Recovery of Cerebral Metabolism with Acute Levodopa Treatment." *Journal of Neurochemistry* 127 (3): 365–77.
- Barb, a W, S K Hekmatyar, J N Glushka, and J H Prestegard. 2013. "Probing Alanine Transaminase Catalysis with Hyperpolarized ^{13}C -Pyruvate." *Journal of Magnetic Resonance* 228: 59–65.
- Benabid, AL, P Pollak, C Gross, D Hoffmann, A Benazzouz, DM Gao, A Laurent, M Gentil, and J Perret. 1994. "Acute and Long-Term Effects of Subthalamic Nucleus Stimulation in Parkinson's Disease." *Stereotact Funct Neurosurg* 62: 76–84.
- Benabid, AL, P Pollak, A Louveau, S Henry, and J De Rougemont. 1987. "Combined (thalamotomy and Stimulation) Stereotactic Surgery of the VIM Thalamic Nucleus for Bilateral Parkinson Disease." *Applied Neurophysiology* 50 (1-6): 344–46.
- Benarroch, E. 2008. "N-Acetylaspartate and N-Acetylaspartylglutamate: Neurobiology and Clinical Significance." *Neurology* 70: 1353–57.
- Bentivoglio, Marina, and Krister Kristensson. 2014. "Tryps and Trips: Cell Trafficking across the 100-Year-Old Blood-Brain Barrier." *Trends in Neurosciences* 37 (6): 325–33.
- Bezard, Erwan, Christelle Imbert, Xavier Deloire, Bernard Bioulac, and Christian E Gross. 1997. "A Chronic MPTP Model Reproducing the Slow Evolution of Parkinson's Disease: Evolution of Motor Symptoms in the Monkey." *Brain Research* 766 (1-2): 107–12.
- Bhattacharya, Pratip, Eduard Y Chekmenev, William H Perman, Kent C Harris, Alexander P Lin, Valerie A Norton, Chou T Tan, Brian D Ross, and Daniel P Weitekamp. 2007. "Towards Hyperpolarized ^{13}C -Succinate Imaging of Brain Cancer." *Journal of Magnetic Resonance* 186 (1): 150–55.
- Bifone, A, Y Q Song, R Seydoux, R E Taylor, B M Goodson, T Pietrass, T F Budinger, G Navon, and A Pines. 1996. "NMR of Laser-Polarized Xenon in Human Blood." *PNAS* 93 (23): 12932–36.
- Billingsley, Kelvin L, Jae Mo Park, Sonal Josan, Ralph Hurd, Dirk Mayer, Eleanor Spielman-Sun, Dwight G Nishimura, James D Brooks, and Daniel Spielman. 2014. "The Feasibility of Assessing Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Cellular Models of Prostate Cancer with Hyperpolarized [1- ^{13}C]-Ketoisocaproate." *Magnetic Resonance Imaging* 32 (7): 791–95.
- Björklund, Anders, and Stephen B Dunnett. 2007. "Dopamine Neuron Systems in the Brain: An Update." *Trends in Neurosciences* 30 (5): 194–202.
- Blandini, F, G Nappi, C Tassorelli, and E Martignoni. 2000. "Functional Changes of the Basal Ganglia Circuitry in Parkinson's Disease." *Prog Neurobiol* 62: 63–88.
- Bloch, F. 1946. "Nuclear Induction." *Physical Review* 70: 460–74.

- Bohndiek, Sarah E, Mikko I Kettunen, De-en Hu, Brett W C Kennedy, Joan Boren, Ferdia a Gallagher, and Kevin M Brindle. 2011. "Hyperpolarized [1-¹³C]-Ascorbic and Dehydroascorbic Acid: Vitamin C as a Probe for Imaging Redox Status *in Vivo*." *Journal of the American Chemical Society* 133 (30): 11795–801.
- Bornet, Aurélien, Roberto Melzi, Sami Jannin, and Geoffrey Bodenhausen. 2012. "Cross Polarization for Dissolution Dynamic Nuclear Polarization Experiments at Readily Accessible Temperatures $1.2 < T < 4.2$ K." *Applied Magnetic Resonance* 43 (1-2): 107–17.
- Boutin, Céline, Hervé Desvaux, Marie Carrière, François Leteurtre, Nadège Jamin, Yves Boulard, and Patrick Berthault. 2011. "Hyperpolarized ¹²⁹Xe NMR Signature of Living Biological Cells." *NMR in Biomedicine* 24 (10): 1264–69.
- Brand, A, C Richter-Landsberg, and D Leibfritz. 1993. "Multinuclear NMR Studies on the Energy Metabolism of Glial and Neuronal Cells." *Developmental Neuroscience* 15 (3-5): 289–98.
- Brindle, Kevin M, Sarah E Bohndiek, Ferdia a Gallagher, and Mikko I Kettunen. 2011. "Tumor Imaging Using Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopy." *Magnetic Resonance in Medicine* 66 (2): 505–19.
- Brooks, David J. 2000. "Dopamine Agonists : Their Role in the Treatment of Parkinson ' S Disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatryeurology, Neurosurgery* 65: 685–90.
- Butt, Sadia a, Lise V Sjøgaard, Peter O Magnusson, Mette H Lauritzen, Christoffer Laustsen, Per Akesson, and Jan H Ardenkjær-Larsen. 2012. "Imaging Cerebral 2-Ketoisocaproate Metabolism with Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(8): 1508-1514.
- Butt, Sadia, Lise V Sjøgaard, Jan H Ardenkjaer-Larsen, Mette H Lauritzen, Lars H Engelholm, Olaf B Paulson, Osman Mirza, Susanne Holck, Peter Magnusson, and Per Akesson. 2014. "Monitoring Mammary Tumor Progression and Effect of Tamoxifen Treatment in MMTV-PyMT Using MRI and Magnetic Resonance Spectroscopy with Hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate." *Magnetic Resonance in Medicine* doi:10.1002/mrm.25095.
- C**
- Cabella, C, M Karlsson, C Canapè, G Catanzaro, S Colombo Serra, L Miragoli, L Poggi, et al. 2013. "In Vivo and in Vitro Liver Cancer Metabolism Observed with Hyperpolarized [5-¹³C]glutamine." *Journal of Magnetic Resonance* 232: 45–52.
- Calabresi, P, N Mercuri, G Sancesario, and G Bernardi. 1996. "Electrophysiology of Dopamine Denervated Striatal Neurons: Implications for Parkinson's Disease." *Brain* 116: 433–52.
- Callesen, Mette Buhl, Jørgen Scheel-Krüger, Morten L Kringelbach, and Arne Møller. 2013. "A Systematic Review of Impulse Control Disorders in Parkinson's Disease." *Journal of Parkinson's Disease* 3 (2): 105–38.
- Cannon, Jason R, Victor Tapias, Hye Mee Na, Anthony S Honick, Robert E Drolet, and J Timothy Greenamyre. 2009. "A Highly Reproducible Rotenone Model of Parkinson's Disease." *Neurobiology of Disease* 34 (2): 279–90.
- Carlsson, A, and B Waldeck. 1958. "A Fluorimetric Method for the Determination of Dopamine (3-Hydroxytyramine)." *Acta Physiologica Scandinavica* 44 (3-4): 293–98.
- Carver, TR, and CP Slichter. 1953. "Polarization of Nuclear Spins in Metals." *Phys Rev* 92: 212–13.

- Charles, David, Peter E Konrad, Joseph S Neimat, Anna L Molinari, Michael G Tramontana, Stuart G Finder, Chandler E Gill, et al. 2014. "Parkinsonism and Related Disorders Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation in Early Stage Parkinson ' S Disease." *Parkinsonism & Related Disorders* 20 (7): 731–37.
- Chassain, Carine, Guy Bielicki, Carole Carcenac, Anne-Claire Ronsin, Jean-Pierre Renou, Marc Savasta, and Franck Durif. 2013. "Does MPTP Intoxication in Mice Induce Metabolite Changes in the Nucleus Accumbens? A ^1H Nuclear MRS Study." *NMR in Biomedicine* 26 (3): 336–47.
- Chassain, Carine, Guy Bielicki, Jean-pierre Donnat, Jean-pierre Renou, Alain Eschalier, and Franck Durif. 2005. "Cerebral Glutamate Metabolism in Parkinson ' S Disease : An *in Vivo* Dynamic ^{13}C MRS Study in the Rat." *Experimental Neurology* 191: 276–84.
- Chassain, Carine, Guy Bielicki, Elodie Durand, and Fatma Essafi. 2008. "Metabolic Changes Detected by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy *in Vivo* and *in Vitro* in a Murin Model of Parkinson ' S Disease , the MPTP-Intoxicated Mouse." *Journal of Neurochemistry* 105: 874–82.
- Chassain, Carine, Guy Bielicki, Cécile Keller, Jean-Pierre Renou, and Franck Durif. 2010. "Metabolic Changes Detected *in Vivo* by ^1H MRS in the MPTP-Intoxicated Mouse." *NMR in Biomedicine* 23 (6): 547–53.
- Chaudhry, Farrukh A, Richard J Reimer, and Robert H Edwards. 2002. "The Glutamine Commute: Take the N Line and Transfer to the A." *The Journal of Cell Biology* 157 (3): 349–55.
- Chaumeil, Myriam M, Peder E Z Larson, Sarah M Woods, Larry Cai, Pia Eriksson, Aaron E Robinson, Janine M Lupo, et al. 2014. "Hyperpolarized [$1-^{13}\text{C}$] Glutamate: A Metabolic Imaging Biomarker of IDH1 Mutational Status in Glioma." *Cancer Research* doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0680.
- Chaumeil, Myriam M, Peder E Z Larson, Hikari A I Yoshihara, Olivia M Danforth, Daniel B Vigneron, Sarah J Nelson, Russell O Pieper, Joanna J Phillips, and Sabrina M Ronen. 2013a. "Non-Invasive *in Vivo* Assessment of IDH1 Mutational Status in Glioma." *Nature Communications* 4: 1–12.
- Chaumeil, Myriam M, Tomoko Ozawa, IlWoo Park, Kristen Scott, C David James, Sarah J Nelson, and Sabrina M Ronen. 2012. "Hyperpolarized ^{13}C MR Spectroscopic Imaging Can Be Used to Monitor Everolimus Treatment *in Vivo* in an Orthotopic Rodent Model of Glioblastoma." *NeuroImage* 59 (1): 193–201.
- Chen, Albert P, Mark J Albers, Charles H Cunningham, Susan J Kohler, Yi-Fen Yen, Ralph E Hurd, James Tropp, et al. 2007. "Hyperpolarized ^{13}C Spectroscopic Imaging of the TRAMP Mouse at 3T-Initial Experience." *Magnetic Resonance in Medicine* 58 (6): 1099–1106..
- Chen, Albert P, John Kurhanewicz, Robert Bok, Duan Xu, David Joun, Vickie Zhang, Sarah J Nelson, Ralph E Hurd, and Daniel B Vigneron. 2008. "Feasibility of Using Hyperpolarized [$1-^{13}\text{C}$]lactate as a Substrate for *in Vivo* Metabolic ^{13}C MRSI Studies." *Magnetic Resonance Imaging* 26 (6): 721–26.
- Cheng, Tian, Mor Mishkovsky, Jessica A M Bastiaansen, Olivier Ouari, Patrick Hautle, Paul Tordo, Ben van den Brandt, and Arnaud Comment. 2013. "Automated Transfer and Injection of Hyperpolarized Molecules with Polarization Measurement prior to *in Vivo* NMR." *NMR in Biomedicine* 26 (11): 1582–88.
- Clatworthy, Menna R, Mikko I Kettunen, De-En Hu, Rebecca J Mathews, Timothy H Witney, Brett W C Kennedy, Sarah E Bohndiek, et al. 2012. "Magnetic Resonance Imaging with Hyperpolarized [$1,4-^{13}\text{C}$]fumarate Allows Detection of Early Renal Acute Tubular Necrosis." *PNAS* 109 (33): 13374–79.
- Connelly, A, G D Jackson, J S Duncan, M D King, and D G Gadian. 1994. "Magnetic Resonance Spectroscopy in Temporal Lobe Epilepsy." *Neurology* 44 (8): 1411–17.
- Cooper, IS. 1953. "Ligation of the Anterior Choroidal Artery for Involuntary Movements; Parkinsonism." *Psychiatr Q* 27 (2): 17–19.

Cotzias, G C, M H Van Woert, and L M Schiffer. 1967. "Aromatic Amino Acids and Modification of Parkinsonism." *The New England Journal of Medicine* 276 (7): 374–79.

D

Daubner, S Colette, Tiffany Le, and Shanzhi Wang. 2011. "Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508 (1): 1–12.

Dauer, William, and Serge Przedborski. 2003. "Parkinson ' S Disease : Mechanisms and Models." *Neuron* 39: 889–909.

Davie, CA, GK Wznning, GJ Barker, PS Tofts, D Phil, BE Kendall, N Quinn, WI McDonald, CD Marsden, and DH. Miller. 1995. "Differentiation of Multiple System Atrophy from Idiopathic Parkinson's Disease Using Proton Magnetic Resonance Spectroscopy." *Ann Neurol* 37: 204–10.

Davis, G. C, A. C Williams, S. P Markey, M. H Ebert, E. D Caine, C. M Reichert, and I. J Kopin. 1979. "Chronic Parkinsonism Secondary to Intravenous Injection of Meperidine Analogues." *Psychiatry Res.* 1: 249–54.

Day, Sam E, Mikko I Kettunen, Murali Krishna Cherukuri, James B Mitchell, Martin J Lizak, H Douglas Morris, Shingo Matsumoto, Alan P Koretsky, and Kevin M Brindle. 2010. "Detecting Response of Rat C6 Glioma Tumors to Radiotherapy Using Hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate and ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging." *Magnetic Resonance in Medicine* 563: 557–63.

Day, Sam E, Mikko I Kettunen, Ferdia a Gallagher, De-En Hu, Mathilde Lerche, Jan Wolber, Klaes Golman, Jan Henrik Ardenkjaer-Larsen, and Kevin M Brindle. 2007. "Detecting Tumor Response to Treatment Using Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy." *Nature Medicine* 13 (11): 1382–87. doi:10.1038/nm1650.

Deelchand, Dinesh K, Alexander A Shestov, Dee M Koski, Kâmil Uğurbil, and Pierre-Gilles Henry. 2009. "Acetate Transport and Utilization in the Rat Brain." *Journal of Neurochemistry* 109 Suppl (May): 46–54.

DeLong, M R. 1990. "Primate Models of Movement Disorders of Basal Ganglia Origin." *Trends in Neurosciences* 13 (7): 281–85.

Deumens, Ronald, Arjan Blokland, and Jos Prickaerts. 2002. "Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway." *Experimental Neurology* 175 (2): 303–17.

Dubost, Emmanuelle, Naoko Kotera, Sébastien Garcia-Argote, Yves Boulard, Estelle Léonce, Céline Boutin, Patrick Berthault, Christophe Dugave, and Bernard Rousseau. 2013. "Synthesis of a Functionalizable Water-Soluble Cryptophane-111." *Organic Letters* 15 (11): 2866–68.

Durif, Franck, Jean-jacques Lemaire, Bérengère Debilly, Gérard Dordain, and Gabriel Montpied. 1999. "Acute and Chronic Effects of Anteromedial Globus Pallidus Stimulation in Parkinson ' S Disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 15 (2): 315–21.

E

Emir, Uzay E, Paul J Tuite, and Gülin Öz. 2012. "Elevated Pontine and Putamenal GABA Levels in Mild-Moderate Parkinson Disease Detected by 7 Tesla Proton MRS." *PloS One* 7 (1): e30918.

F

- Federico, F, IL Simone, V Lucivero, M De Mari, P Giannini, G Iliceto, DM Mezzapesa, and P Lamberti. 1997. "Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62: 239–42.
- Fox, Matthew S, Alexei Ouriadov, and Giles E Santyr. 2013. "Comparison of Hyperpolarized ^3He and ^{129}Xe MRI for the Measurement of Absolute Ventilated Lung Volume in Rats." *Magnetic Resonance in Medicine* doi:10.1002/mrm.24746.
- Friesen-Waldner, Lanette, Albert Chen, Will Mander, Timothy J Scholl, and Charles a McKenzie. 2012. "Optimisation of Dynamic Nuclear Polarisation of [1-(13)C] Pyruvate by Addition of Gadolinium-Based Contrast Agents." *Journal of Magnetic Resonance* 223: 85–89.

G

- Gallagher, F, Mikko I Kettunen, Sam E Day, De-en Hu, Magnus Karlsson, Anna Gisselsson, Mathilde H Lerche, and Kevin M Brindle. 2011. "Detection of Tumor Glutamate Metabolism *in Vivo* Using ^{13}C Magnetic Resonance Spectroscopy and Hyperpolarized [1- ^{13}C]glutamate." *Magnetic Resonance in Medicine* 66 (1): 18–23.
- Gallagher, Ferdia A, Mikko I Kettunen, Sam E Day, De-En Hu, Jan Henrik Ardenkjaer-Larsen, René in 't Zandt, Pernille R Jensen, et al. 2008. "Magnetic Resonance Imaging of pH *in Vivo* Using Hyperpolarized ^{13}C -Labelled Bicarbonate." *Nature* 453 (7197): 940–43.
- Gallagher, Ferdia A, Mikko I Kettunen, Sam E Day, De-en Hu, Magnus Karlsson, Anna Gisselsson, Mathilde H Lerche, and Kevin M Brindle. 2011. "Detection of Tumor Glutamate Metabolism *In Vivo* Using C Magnetic Resonance Spectroscopy and Hyperpolarized [1- ^{13}C] Glutamate" 23: 18–23.
- Gallagher, Ferdia a, Mikko I Kettunen, Sam E Day, Mathilde Lerche, and Kevin M Brindle. 2008. " ^{13}C MR Spectroscopy Measurements of Glutaminase Activity in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Using Hyperpolarized ^{13}C -Labeled Glutamine." *Magnetic Resonance in Medicine* 60 (2): 253–57.
- Goergen, S K, H Ang, F Wong, E A Carse, M Charlton, R Evans, G Whiteley, et al. 2014. "Early MRI in Term Infants with Perinatal Hypoxic-Ischaemic Brain Injury: Interobserver Agreement and MRI Predictors of Outcome at 2 Years." *Clinical Radiology* 69 (1): 72–81.
- Goetz, Christopher G. 2011. "The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1): a008862.
- Golman, K. 2003. "Molecular Imaging Using Hyperpolarized ^{13}C ." *British Journal of Radiology* 76 (2): S118–S127.
- Golman, Klaes, René in 't Zandt, and Mikkel Thaning. 2006. "Real-Time Metabolic Imaging." *PNAS* 103 (30): 11270–75.

- Gordon, Jeremy W, Sean B Fain, and Ian J Rowland. 2012. "Effect of Lanthanide Ions on Dynamic Nuclear Polarization Enhancement and Liquid-State T1 Relaxation." *Magnetic Resonance in Medicine* 68 (6): 1949–54.
- Govindaraju, Varanavasi, Karl Young, and Andrew A Maudsley. 2000. "Proton NMR Chemical Shifts and Coupling Constants for Brain Metabolites", 129–53.
- Grace, Anthony A, Stan B Floresco, Yukiori Goto, and Daniel J Lodge. 2007. "Regulation of Firing of Dopaminergic Neurons and Control of Goal-Directed Behaviors." *Trends in Neurosciences* 30 (5): 220–27.
- Graybiel, A M, J J Canales, and C Capper-Loup. 2000. "Levodopa-Induced Dyskinesias and Dopamine-Dependent Stereotypies: A New Hypothesis." *Trends in Neurosciences* 23 (10): S71–7.
- Green, Richard a, Ralph W Adams, Simon B Duckett, Ryan E Mewis, David C Williamson, and Gary G R Green. 2012. "The Theory and Practice of Hyperpolarization in Magnetic Resonance Using Parahydrogen." *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 67: 1–48.
- Gruetter, R, E J Novotny, S D Boulware, G F Mason, D L Rothman, G I Shulman, J W Prichard, and R G Shulman. 1994. "Localized ^{13}C NMR Spectroscopy in the Human Brain of Amino Acid Labeling from D-[1- ^{13}C]glucose." *Journal of Neurochemistry* 63 (4): 1377–85.
- Guevara, C, C Blain, D Stahl, D Lythgoe, P Leigh, and G Barker. 2010. "Quantitative Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging in Parkinson's Disease, Progressive Supranuclear Palsy and Multiple System Atrophy." *Eur J Neurol* 17: 1193–1202.
- Guridi, J, R González-Redondo, and J a Obeso. 2012. "Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease." *Parkinson's Disease* 2012: 943159.

H

- Hagell, P, and P Brundin. 2001. "Cell Survival and Clinical Outcome Following Intrastratial Transplantation in Parkinson Disease." *J Neuropathol Exp Neurol*. 60 (8): 741–52.
- Halestrap, A P, and N T Price. 1999. "The Proton-Linked Monocarboxylate Transporter (MCT) Family: Structure, Function and Regulation." *The Biochemical Journal* 343: 281–99.
- Hellwig, Sabine, Florian Amtage, Annabelle Kreft, Ralph Buchert, Oliver H Winz, Werner Vach, Timo S Spehl, et al. 2012. "[^{18}F]FDG-PET Is Superior to [^{123}I]IBZM-SPECT for the Differential Diagnosis of Parkinsonism." *Neurology* 79 (13): 1314–22.
- Hu, Simon, Michael Lustig, Albert P Chen, Jason Crane, Adam Kerr, Douglas A C Kelley, Ralph Hurd, et al. 2008. "Compressed Sensing for Resolution Enhancement of Hyperpolarized ^{13}C Flyback 3D-MRSI." *Journal of Magnetic Resonance* 192 (2): 258–64.
- Hu, Simon, Hikari a I Yoshihara, Robert Bok, Jenny Zhou, Minhua Zhu, John Kurhanewicz, and Daniel B Vigneron. 2012. "Use of Hyperpolarized [1- ^{13}C]pyruvate and [2- ^{13}C]pyruvate to Probe the Effects of the Anticancer Agent Dichloroacetate on Mitochondrial Metabolism *in Vivo* in the Normal Rat." *Magnetic Resonance Imaging* 30 (10): 1367–72.
- Hughes, AJ, SE Daniel, and AJ Lees. 2001. "Improved Accuracy of Clinical Diagnosis of Lewy Body Parkinson's Disease." *Neurology*; 57: 1497–99.

Hurd, Ralph E, Yi-Fen Yen, Albert Chen, and Jan Henrik Ardenkjaer-Larsen. 2012. "Hyperpolarized ^{13}C Metabolic Imaging Using Dissolution Dynamic Nuclear Polarization." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 36 (6): 1314–28.

Hurd, Ralph E, Yi-Fen Yen, Dirk Mayer, Albert Chen, David Wilson, Susan Kohler, Robert Bok, et al. 2010. "Metabolic Imaging in the Anesthetized Rat Brain Using Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvate and $[1-^{13}\text{C}]$ Ethyl Pyruvate." *Magnetic Resonance in Medicine* 63 (5): 1137–43.

Hurd, Ralph E, Yi-Fen Yen, James Tropp, Adolf Pfefferbaum, Daniel M Spielman, and Dirk Mayer. 2010. "Cerebral Dynamics and Metabolism of Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate Using Time-Resolved MR Spectroscopic Imaging." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30 (10): 1734–41.

I

Ingham, C A, S H Hood, P Taggart, and G W Arbuthnott. 1998. "Plasticity of Synapses in the Rat Neostriatum after Unilateral Lesion of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway." *The Journal of Neuroscience* 18 (12): 4732–43.

J

Jannin, S, A Bornet, S Colombo, and G Bodenhausen. 2011. "Low-Temperature Cross Polarization in View of Enhancing Dissolution Dynamic Nuclear Polarization in NMR." *Chemical Physics Letters* 517 (4): 234–36.

Jansen, Jacobus F A, Walter H Backes, Klaas Nicolay, and M Eline Kooi. 2006. " ^1H MR Spectroscopy of the Brain: Absolute Quantification of Metabolites." *Radiology* 240 (2): 318–32.

Jonkers, Nadine, Sophie Sarre, Guy Ebinger, and Yvette Michotte. 2002. "MK801 Suppresses the L-DOPA-Induced Increase of Glutamate in Striatum of Hemi-Parkinson Rats." *Brain Research* 926 (1-2): 149–55.

Josan, Sonal, Ralph Hurd, Kelvin Billingsley, Lasitha Senadheera, Jae Mo Park, Yi-Fen Yen, Adolf Pfefferbaum, Daniel Spielman, and Dirk Mayer. 2012. "Effects of Isoflurane Anesthesia on Hyperpolarized ^{13}C Metabolic Measurements in Rat Brain." *Magnetic Resonance in Medicine* 70 (4): 1117-1124.

Josan, Sonal, Jae Mo Park, Ralph Hurd, Yi-Fen Yen, Adolf Pfefferbaum, Daniel Spielman, and Dirk Mayer. 2013. "In Vivo Investigation of Cardiac Metabolism in the Rat Using MRS of Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ and $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate." *NMR in Biomedicine* 26 (12): 1680–87.

K

Kalia, Lorraine V, Suneil K Kalia, Pamela J McLean, Andres M Lozano, and Anthony E Lang. 2013. "A-Synuclein Oligomers and Clinical Implications for Parkinson Disease." *Annals of Neurology* 73 (2): 155–69.

Kaplitt, Michael G, Andrew Feigin, Chengke Tang, Helen L Fitzsimons, Paul Mattis, Patricia A Lawlor, Ross J Bland, et al. 2007. "Safety and Tolerability of Gene Therapy with an Adeno-Associated Virus (AAV) Borne GAD Gene for Parkinson ' S Disease : An Open Label , Phase I Trial." *Lancet* 369: 2097–2105.

Karlsborg, Merete, Lise Korbo, Lisbeth Regeur, and Arne Glad. 2010. "Duodopa Pump Treatment in Patients with Advanced Parkinson ' S Disease." *Dan Med Bull* 57 (6): A4155.

- Karlsson, Magnus, Anna Gisselsson, Sarah K Nelson, Timothy H Witney, Sarah E Bohndiek, Georg Hansson, Torben Peitersen, Mathilde H Lerche, and Kevin M Brindle. 2009. "Production of [1,4-¹³C] Malate from [1,4-¹³C₂] Fumarate Is a Marker of Cell Necrosis and Treatment Response in Tumors" 106 (47): 19801–6.
- Karlsson, Magnus, Pernille Jensen, Jens Ø Duus, Sebastian Meier, and Mathilde H Lerche. 2012. "Development of Dissolution DNP-MR Substrates for Metabolic Research." *Applied Magnetic Resonance* 43 (1-2): 223–236.
- Kastler, A. 1950. "Applications of Polarimetry to Infra-Red and Micro-Wave Spectroscopy." *Nature* 166 (4211): 113.
- Kastler, B, D Vetter, Z Patay, and P Germain. 2011. *Comprendre l'IRM. Manuel D'auto-Apprentissage*.
- Kaushik, S Sivaram, Zackary I Cleveland, Gary P Cofer, Gregory Metz, Denise Beaver, John Nouls, Monica Kraft, et al. 2011. "Diffusion-Weighted Hyperpolarized ¹²⁹Xe MRI in Healthy Volunteers and Subjects with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Magnetic Resonance in Medicine* 65 (4): 1154–65.
- Kawaguchi, Y, C J Wilson, S J Augood, and P C Emson. 1995. "Striatal Interneurons: Chemical, Physiological and Morphological Characterization." *Trends in Neurosciences* 18 (12): 527–35.
- Keshari, Kayvan R, Victor Sai, Zhen J Wang, Henry F Vanbrocklin, John Kurhanewicz, and David M Wilson. 2013. "Hyperpolarized [1-¹³C]dehydroascorbate MR Spectroscopy in a Murine Model of Prostate Cancer: Comparison with ¹⁸F-FDG PET." *Journal of Nuclear Medicine* 54 (6): 922–28.
- Keshari, Kayvan R, Renuka Sriram, Bertram L Koelsch, Mark Van Criekinge, David M Wilson, John Kurhanewicz, and Zhen J Wang. 2013. "Hyperpolarized ¹³C-Pyruvate Magnetic Resonance Reveals Rapid Lactate Export in Metastatic Renal Cell Carcinomas." *Cancer Research* 73 (2): 529–38.
- Kickler, N, P Krack, V Fraix, JF Lebas, L Lamalle, F Durif, A Krainik, C Rémy, C Segebarth, and P Pollak. 2007. "Glutamate Measurement in Parkinson's Disease Using MRS at 3 T Field Strength." *NMR Biomed* 20 (8): 757–62.
- Kierans, Andrea S, Ivan I Kirov, Oded Gonen, Gillian Haemer, Eric Nisenbaum, James S Babb, Robert I Grossman, and Yvonne W Lui. 2014. "Myoinositol and Glutamate Complex Neurometabolite Abnormality after Mild Traumatic Brain Injury." *Neurology* 82 (6): 521–28.
- Kinoshita, Manabu, Nathan Mcdannold, Ferenc A Jolesz, and Kullervo Hynynen. 2006. "Noninvasive Localized Delivery of Herceptin to the Mouse Brain by MRI-Guided Focused Ultrasound-Induced Blood – Brain Barrier Disruption." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (31): 11719–23.
- Kirby, Miranda, Sarah Svenningsen, Amir Owrangi, Andrew Wheatley, Adam Farag, Alexei Ouriadov, Giles E Santyr, et al. 2012. "Hyperpolarized ³He and ¹²⁹Xe MR Imaging in Healthy Volunteers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Radiology* 265 (2): 600–610.
- Kirik, Deniz, Biljana Georgievska, and Anders Björklund. 2004. "Localized Striatal Delivery of GDNF as a Treatment for Parkinson Disease." *Nature Neuroscience* 7 (2): 105–10.
- Kirik, Deniz, Carl Rosenblad, Corinna Burger, Cecilia Lundberg, Teit E Johansen, Nicholas Muzyczka, Ronald J Mandel, and Anders Björklund. 2002. "Parkinson-like Neurodegeneration Induced by Targeted Overexpression of Alpha-Synuclein in the Nigrostriatal System." *The Journal of Neuroscience* 22 (7): 2780–91.
- Kohler, S J, Y Yen, J Wolber, a P Chen, M J Albers, R Bok, V Zhang, et al. 2007. "In Vivo ¹³C Metabolic Imaging at 3T with Hyperpolarized [1-¹³C] Pyruvate." *Magnetic Resonance in Medicine* 58 (1): 65–69.

Krack, P, P Limousin, AL Benabid, and P Pollak. 1997. "Chronic Stimulation of Subthalamic Nucleus Improves Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease." *Lancet* 350 (9092): 1676.

Kumar, Rajeev, Andres M Lozano, Elspeth Sime, and Anthony E Lang. 2003. "Long-Term Follow-up of Thalamic Deep Brain Stimulation for Essential and Parkinsonian Tremor." *Neurology* 61 (11): 1601-1604.

L

Langston, J W, P Ballard, J W Tetrad, and I Irwin. 1983. "Chronic Parkinsonism in Humans due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis." *Science* 219 (4587): 979-80.

Larson, Peder E Z, Robert Bok, Adam B Kerr, Michael Lustig, Simon Hu, Albert P Chen, Sarah J Nelson, John M Pauly, John Kurhanewicz, and Daniel B Vigneron. 2010. "Investigation of Tumor Hyperpolarized [1-¹³C]-Pyruvate Dynamics Using Time-Resolved Multiband RF Excitation Echo-Planar MRSI." *Magnetic Resonance in Medicine* 63 (3): 582-91.

Larson, Peder E Z, Simon Hu, Michael Lustig, Adam B Kerr, Sarah J Nelson, John Kurhanewicz, John M Pauly, and Daniel B Vigneron. 2011. "Fast Dynamic 3D MR Spectroscopic Imaging with Compressed Sensing and Multiband Excitation Pulses for Hyperpolarized ¹³C Studies." *Magnetic Resonance in Medicine* 65 (3): 610-19.

Larson, Peder E Z, Adam B Kerr, Albert P Chen, Michael S Lustig, Matthew L Zierhut, Simon Hu, Charles H Cunningham, John M Pauly, John Kurhanewicz, and Daniel B Vigneron. 2008. "Multiband Excitation Pulses for Hyperpolarized ¹³C Dynamic Chemical-Shift Imaging." *Journal of Magnetic Resonance* 194 (1): 121-27.

Lau, Angus Z, Albert P Chen, Ralph E Hurd, and Charles H Cunningham. 2011. "Spectral-Spatial Excitation for Rapid Imaging of DNP Compounds." *NMR in Biomedicine* 24 (8): 988-96.

Lebon, Vincent, Kitt F Petersen, Gary W Cline, Jun Shen, Graeme F Mason, Sylvie Dufour, Kevin L Behar, Gerald I Shulman, and Douglas L Rothman. 2002. "Astroglial Contribution to Brain Energy Metabolism in Humans Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Elucidation of the Dominant Pathway for Neurotransmitter Glutamate Repletion and Measurement of Astrocytic Oxidative Metabolism." *The Journal of Neuroscience* 22 (5): 1523-31.

Lee, Jung Ho, Yusuke Okuno, and Silvia Cavagnero. 2014. "Sensitivity Enhancement in Solution NMR: Emerging Ideas and New Frontiers." *Journal of Magnetic Resonance* 241: 18-31.

Leviel, Vincent. 2011. "Dopamine Release Mediated by the Dopamine Transporter, Facts and Consequences." *Journal of Neurochemistry* 118 (4): 475-89.

Levin, BE, HL Katzen, A Maudsley, J Post, C Myerson, V Govind, F Nahab, B Scanlon, and A Mittel. 2014. "Whole Brain Proton MR Spectroscopic Imaging in Parkinson's Disease." *J Neuroimaging* 24 (1): 39-44.

Lewitt, Peter A, Ali R Rezai, Maureen A Leehey, Steven G Ojemann, Alice W Flaherty, Emad N Eskandar, Sandra K Kostyk, et al. 2011. "Articles AAV2-GAD Gene Therapy for Advanced Parkinson ' S Disease : A Double-Blind , Sham-Surgery Controlled , Randomised Trial." *Lancet Neurology* 10: 309-19.

Lindfors, N, and U Ungerstedt. 1990. "Bilateral Regulation of Glutamate Tissue and Extracellular Levels in Caudate-Putamen by Midbrain Dopamine Neurons." *Neuroscience Letters* 115 (2-3): 248-52.

Liou, H H, M C Tsai, C J Chen, J S Jeng, Y C Chang, S Y Chen, and R C Chen. 1997. "Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Case-Control Study in Taiwan." *Neurology* 48 (6): 1583-88.

- Liu, Zaiyi, Tetsuro Araki, Yuka Okajima, Mitchell Albert, and Hiroto Hatabu. 2014. "Pulmonary Hyperpolarized Noble Gas MRI: Recent Advances and Perspectives in Clinical Application." *European Journal of Radiology* 83 (7): 1282–91.
- Lu, Hanbing, Steven Demny, Yantao Zuo, William Rea, Leiming Wang, Svetlana I Chefer, D Bruce Vaupel, Yihong Yang, and Elliot A Stein. 2010. "Temporary Disruption of the Rat Blood-Brain Barrier with a Monoclonal Antibody: A Novel Method for Dynamic Manganese-Enhanced MRI." *NeuroImage* 50 (1): 7–14.
- Lumata, Lloyd, Zoltan Kovacs, A Dean Sherry, Craig Malloy, Stephen Hill, Johan van Tol, Lu Yu, Likai Song, and Matthew E Merritt. 2013. "Electron Spin Resonance Studies of Trityl OX063 at a Concentration Optimal for DNP." *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (24): 9800–9807.
- Lumata, Lloyd, Matthew E Merritt, Craig R Malloy, a Dean Sherry, and Zoltan Kovacs. 2012. "Impact of Gd^{3+} on DNP of $[1-^{13}C]$ pyruvate Doped with Trityl OX063, BDPA, or 4-Oxo-TEMPO." *The Journal of Physical Chemistry. A* 116 (21): 5129–38.
- Lupo, Janine M, Albert P Chen, Matthew L Zierhut, Robert A Bok, Charles H Cunningham, John Kurhanewicz, Daniel B Vigneron, and Sarah J Nelson. 2010. "Analysis of Hyperpolarized Dynamic ^{13}C Lactate Imaging in a Transgenic Mouse Model of Prostate Cancer." *Magnetic Resonance Imaging* 28 (2): 153–62.



- Maltezos, S, J Horder, S Coghlan, C Skirrow, R O’Gorman, T J Lavender, M A Mendez, et al. 2014. "Glutamate/glutamine and Neuronal Integrity in Adults with ADHD: A Proton MRS Study." *Translational Psychiatry* 4: e373.
- Maly, Thorsten, Galia T Debelouchina, Vikram S Bajaj, Kan-Nian Hu, Chan-Gyu Joo, Melody L Mak-Jurkauskas, Jagadishwar R Sirigiri, et al. 2008. "Dynamic Nuclear Polarization at High Magnetic Fields." *The Journal of Chemical Physics* 128 (5): 052211.
- Manning-Bog, Amy B, Alison L McCormack, Jie Li, Vladimir N Uversky, Anthony L Fink, and Donato A Di Monte. 2002. "The Herbicide Paraquat Causes up-Regulation and Aggregation of Alpha-Synuclein in Mice: Paraquat and Alpha-Synuclein." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1641–44.
- Marjańska, Małgorzata, Isabelle Iltis, Alexander a Shestov, Dinesh K Deelchand, Christopher Nelson, Kâmil Uğurbil, and Pierre-Gilles Henry. 2010. "In vivo ^{13}C Spectroscopy in the Rat Brain Using Hyperpolarized $[1-^{13}C]$ pyruvate and $[2-^{13}C]$ pyruvate." *Journal of Magnetic Resonance* 206: 210–18.
- Martin, E, D Jeanmonod, A Morel, E Zadicario, and B Werner. 2009. "High-Intensity Focused Ultrasound for Noninvasive Functional Neurosurgery." *Ann Neurol* 66 (6): 858–61.
- Merello, M, S Starkstein, M I Nouzeilles, G Kuzis, and R Leiguarda. 2001. "Bilateral Pallidotomy for Treatment of Parkinson ' S Disease Induced Corticobulbar Syndrome and Psychic Akinesia Avoidable by Globus Pallidus Lesion Combined with Contralateral Stimulation." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 71: 611–14.
- Merritt, Matthew E, Crystal Harrison, Charles Storey, F Mark Jeffrey, a Dean Sherry, and Craig R Malloy. 2007. "Hyperpolarized ^{13}C Allows a Direct Measure of Flux through a Single Enzyme-Catalyzed Step by NMR." *PNAS* 104 (50): 19773–77.
- Meshul, C K, J P Cogen, H W Cheng, C Moore, L Krentz, and T H McNeill. 2000. "Alterations in Rat Striatal Glutamate Synapses Following a Lesion of the Cortico- And/or Nigrostriatal Pathway." *Experimental Neurology* 165 (1): 191–206.

- Meshul, C K, N Emre, C M Nakamura, C Allen, M K Donohue, and J F Buckman. 1999. "Time-Dependent Changes in Striatal Glutamate Synapses Following a 6-Hydroxydopamine Lesion." *Neuroscience* 88 (1): 1–16.
- Mignion, Lionel, Prasanta Dutta, Gary V Martinez, Parastou Foroutan, Robert J Gillies, and Bénédicte F Jordan. 2014. "Monitoring Chemotherapeutic Response by Hyperpolarized ^{13}C -Fumarate MRS and Diffusion MRI." *Cancer Research* 74 (3): 686–94.
- Mishkovsky, Mor, Arnaud Comment, and Rolf Gruetter. 2012. "In Vivo Detection of Brain Krebs Cycle Intermediate by Hyperpolarized Magnetic Resonance." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32 (12): 2108–13.
- Moffett, J R, M A Namboodiri, C B Cangro, and J H Neale. 1991. "Immunohistochemical Localization of N-Acetylaspartate in Rat Brain." *Neuroreport* 2 (3): 131–34.
- Moffett, John R, Brian Ross, Peethambarun Arun, Chikkathur N Madhavarao, and Aryan M A Namboodiri. 2007. "N-Acetylaspartate in the CNS: From Neurodiagnostics to Neurobiology." *Progress in Neurobiology* 81 (2): 89–131.
- Mugler, John P, and Talissa A Altes. 2013. "Hyperpolarized ^{129}Xe MRI of the Human Lung." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 37 (2): 313–31.

N

- Nelson, Sarah J, John Kurhanewicz, Daniel B Vigneron, Peder E Z Larson, Andrea L Harzstark, Marcus Ferrone, Mark van Criekinge, et al. 2013. "Metabolic Imaging of Patients with Prostate Cancer Using Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate." *Science Translational Medicine* 5 (198): 198-108.
- Nijhawan, S.R, S.J Banks, T.Z Aziz, I Panourias, R. Gregory, and J Yianni. 2009. "Changes in Cognition and Health-Related Quality of Life with Unilateral Thalamotomy for Parkinsonian Tremor." *J Clin Neurosci* 16 (1): 44–50.
- Nissen, T, N Malek, K A Grosset, E J Newman, J Patterson, D Hadley, and D G Grosset. 2014. "Baseline $[^{123}\text{I}]$ FP-CIT SPECT (DaTSCAN) Severity Correlates with Medication Use at 3 Years in Parkinson's Disease." *Acta Neurologica Scandinavica* 129 (3): 204–8.
- Nurmi, E, H M Ruottinen, J Bergman, M Haaparanta, O Solin, P Sonninen, and J O Rinne. 2001. "Rate of Progression in Parkinson's Disease: A 6- $[^{18}\text{F}]$ fluoro-L-Dopa PET Study." *Movement Disorders* 16 (4): 608–15.
- Nutt, J.G., K.J. Burchiel, C.L. Comella, J. Jankovic, A.E. Lang, E.R. Jr. Laws, A.M Lozano, et al. 2003. "ICV GDNF Study Group. Implanted Intracerebroventricular. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. Randomized, Double-Blind Trial of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in PD." *Neurology* 60 (1): 69–73.

O

- Obeso, José a, and José L Lanciego. 2011. "Past, Present, and Future of the Pathophysiological Model of the Basal Ganglia." *Frontiers in Neuroanatomy* 5: 39.
- Obeso, Jose A, Maria C Rodriguez-Oroz, Christopher G Goetz, Concepcion Marin, Jeffrey H Kordower, Manuel Rodriguez, Etienne C Hirsch, Matthew Farrer, Anthony H V Schapira, and Glenda Halliday. 2010. "Missing Pieces in the Parkinson's Disease Puzzle." *Nature Medicine* 16 (6): 653–61.

Odekerken, Vincent J J, Teus Van Laar, Michiel J Staal, Arne Mosch, Carel F E Hoff, Peter C G Nijssen, Guus N Beute, et al. 2013. "Articles Subthalamic Nucleus versus Globus Pallidus Bilateral Deep Brain Stimulation for Advanced Parkinson ' S Disease (NSTAPS Study): A Randomised Controlled Trial." *Lancet Neurology* 12 (1): 37–44.

Olanow, C Warren, Olivier Rascol, Robert Hauser, Paul D Feigin, Joseph Jankovic, Anthony Lang, William Langston, et al. 2009. "A Double-Blind, Delayed-Start Trial of Rasagiline in Parkinson's Disease." *The New England Journal of Medicine* 361 (13): 1268–78.

Olanow, C.W, G.G Goetz, J.H Kordower, A.J Stoessl, V Sossi, M.F Brin, K.M Shannon, et al. 2003. "Disease, A Double-Blind Controlled Trial of Bilateral Fetal Nigral Transplantation in Parkinson's." *Annals of Neurology* 54 (3): 403–14.

Olsson, Lars E, Chun-Ming Chai, Oskar Axelsson, Magnus Karlsson, Klaes Golman, and J Stefan Petersson. 2006. "MR Coronary Angiography in Pigs with Intraarterial Injections of a Hyperpolarized ¹³C Substance." *Magnetic Resonance in Medicine* 55 (4): 731–37.

Overhauser, AW. 1953. "Polarization of Nuclei in Metals." *Phys Rev* 92: 411–15.

P

Palfi, Stéphane, Jean Marc Gurruchaga, G Scott Ralph, Helene Lepetit, Sonia Lavisce, Philip C Buttery, Colin Watts, et al. 2014. "Long-Term Safety and Tolerability of ProSavin , a Lentiviral Vector-Based Gene Therapy for Parkinson ' S Disease : A Dose Escalation , Open-Label , Phase 1 / 2 Trial." *Lancet* 383: 1138–46.

Park, Ilwoo, Robert Bok, Tomoko Ozawa, Joanna J Phillips, C David James, Daniel B Vigneron, Sabrina M Ronen, and Sarah J Nelson. 2011a. "Detection of Early Response to Temozolomide Treatment in Brain Tumors Using Hyperpolarized ¹³C MR Metabolic Imaging." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 1290: 1284–90.

Park, Ilwoo, Simon Hu, Robert Bok, Tomoko Ozawa, Motokazu Ito, Joydeep Mukherjee, Joanna J Phillips, et al. 2013. "Evaluation of Heterogeneous Metabolic Profile in an Orthotopic Human Glioblastoma Xenograft Model Using Compressed Sensing Hyperpolarized 3D ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging." *Magnetic Resonance in Medicine* 70 (1): 33–39.

Park, Jae Mo, Sonal Josan, Thomas Grafendorfer, Yi-fen Yen, Ralph E Hurd, Daniel M Spielman, and Dirk Mayer. 2013. "Measuring Mitochondrial Metabolism in Rat Brain *in Vivo* Using MR Spectroscopy of Hyperpolarized [2-¹³C] Pyruvate." *NMR in Biomedicine* 26: 1197–1203.

Park, Jae Mo, Lawrence D Recht, Sonal Josan, Milton Merchant, Taichang Jang, Yi-fen Yen, Ralph E Hurd, Daniel M Spielman, and Dirk Mayer. 2013. "Metabolic Response of Glioma to Dichloroacetate Measured *in Vivo* by Spectroscopic Imaging." *Neuro-Oncology* 15 (4): 433–41.

Patel, T B, and J B Clark. 1979. "Synthesis of N-Acetyl-L-Aspartate by Rat Brain Mitochondria and Its Involvement in Mitochondrial/cytosolic Carbon Transport." *The Biochemical Journal* 184 (3): 539–46.

Pavese, Nicola, and David J Brooks. 2009. "Imaging Neurodegeneration in Parkinson's Disease." *Biochimica et Biophysica Acta* 1792 (7): 722–29.

Pavese, Nicola, Maria Rivero-Bosch, Stephanie J Lewis, Alan L Whone, and David J Brooks. 2011. "Progression of Monoaminergic Dysfunction in Parkinson's Disease: A Longitudinal ¹⁸F-Dopa PET Study." *NeuroImage* 56 (3): 1463–68.

Purcell, EM, HC Torrey, and RV Pound. 1946. "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid." *Phys Rev* 69: 37–38.

Puts, Nicolaas A J, and Richard A E Edden. 2012. "In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy of GABA: A Methodological Review." *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 60: 29–41.

Q

Quirk, James D, Barbara A Lutey, David S Gierada, Jason C Woods, Robert M Senior, Stephen S Lefrak, Alexander L Sukstanskii, Mark S Conradi, and Dmitriy A Yablonskiy. 2011. "In Vivo Detection of Acinar Microstructural Changes in Early Emphysema with ³He Lung Morphometry." *Radiology* 260 (3): 866–74.

R

Rajput, A H, B Rozdilsky, and A Rajput. 1991. "Accuracy of Clinical Diagnosis in Parkinsonism--a Prospective Study." *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 18 (3): 275–78.

Rapoport, SI. 2000. "Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier: Principles, Mechanism, and Therapeutic Applications." *Cellular and Molecular Neurobiology* 20 (2): 217–30.

Rascol, O, D J Brooks, A D Korczyn, P P De Deyn, C E Clarke, and A E Lang. 2000. "A Five-Year Study of the Incidence of Dyskinesia in Patients with Early Parkinson's Disease Who Were Treated with Ropinirole or Levodopa. 056 Study Group." *The New England Journal of Medicine* 342 (20): 1484–91.

Rehncrona, S, B Johnels, H Widner, A Törnqvist, M Hariz, and O Sydow. 2003. "Long-Term Efficacy of Thalamic Deep Brain Stimulation for Tremor: Double-Blind Assessments." *Movement Disorders* 18 (2): 163–70.

Reynolds, Steven, Adriana Bucur, Michael Port, Tooba Alizadeh, Samira M Kazan, Gillian M Tozer, and Martyn N J Paley. 2014. "A System for Accurate and Automated Injection of Hyperpolarized Substrate with Minimal Dead Time and Scalable Volumes over a Large Range." *Journal of Magnetic Resonance* 239: 1–8.

Rodrigues, Tiago B, Eva M Serrao, Brett W C Kennedy, De-En Hu, Mikko I Kettunen, and Kevin M Brindle. 2014. "Magnetic Resonance Imaging of Tumor Glycolysis Using Hyperpolarized ¹³C-Labeled Glucose." *Nature Medicine* 20 (1): 93–97.

Ross, B D. 1991. "Biochemical Considerations in ¹H Spectroscopy. Glutamate and Glutamine; Myo-Inositol and Related Metabolites." *NMR in Biomedicine* 4 (2): 59–63.

Rothman, Douglas L, Henk M De Feyter, Robin A de Graaf, Graeme F Mason, and Kevin L Behar. 2011. "¹³C MRS Studies of Neuroenergetics and Neurotransmitter Cycling in Humans." *NMR in Biomedicine* 24 (8): 943–57.

S

Sanacora, Gerard, Carlos A Zarate, John H Krystal, and Husseini K Manji. 2008. "Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders." *Nature Reviews*. 7 (5): 426–37.

- Scherfler, Christoph, Johannes Schwarz, Angelo Antonini, Donald Grosset, Francesc Valdeoriola, Kenneth Marek, Wolfgang Oertel, Eduardo Tolosa, Andrew J Lees, and Werner Poewe. 2007. "Role of DAT-SPECT in the Diagnostic Work up of Parkinsonism." *Movement Disorders* 22 (9): 1229–38.
- Schmidt, Rita, Christoffer Laustsen, Jean-Nicolas Dumez, Mikko I Kettunen, Eva M Serrao, Irene Marco-Rius, Kevin M Brindle, Jan Henrik Ardenkjaer-Larsen, and Lucio Frydman. 2014. "In Vivo Single-Shot ^{13}C Spectroscopic Imaging of Hyperpolarized Metabolites by Spatiotemporal Encoding." *Journal of Magnetic Resonance* 240: 8–15.
- Schroeder, Marie a, Helen J Atherton, Daniel R Ball, Mark a Cole, Lisa C Heather, Julian L Griffin, Kieran Clarke, George K Radda, and Damian J Tyler. 2009. "Real-Time Assessment of Krebs Cycle Metabolism Using Hyperpolarized ^{13}C Magnetic Resonance Spectroscopy." *The FASEB Journal* 23 (8): 2529–38.
- Schroeder, Marie a, Helen J Atherton, Lisa C Heather, Julian L Griffin, Kieran Clarke, George K Radda, and Damian J Tyler. 2011. "Determining the *in Vivo* Regulation of Cardiac Pyruvate Dehydrogenase Based on Label Flux from Hyperpolarised [$1\text{-}^{13}\text{C}$]pyruvate." *NMR in Biomedicine* 24 (8): 980–87.
- Schroeder, Marie a, Pawel Swietach, Helen J Atherton, Ferdia a Gallagher, Phillip Lee, George K Radda, Kieran Clarke, and Damian J Tyler. 2010. "Measuring Intracellular pH in the Heart Using Hyperpolarized Carbon Dioxide and Bicarbonate: A ^{13}C and ^{31}P Magnetic Resonance Spectroscopy Study." *Cardiovascular Research* 86 (1): 82–91.
- Schulte, Rolf F, Jonathan I Sperl, Eliane Weidl, Marion I Menzel, Martin A Janich, Oleksandr Khagai, Markus Durst, et al. 2013. "Saturation-Recovery Metabolic-Exchange Rate Imaging with Hyperpolarized [$1\text{-}^{13}\text{C}$] Pyruvate Using Spectral-Spatial Excitation." *Magnetic Resonance in Medicine* 69: 1209–16.
- Shchepin, Roman V, Aaron M Coffey, Kevin W Waddell, and Eduard Y Chekmenev. 2014. "Parahydrogen Induced Polarization of $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Phospholactate-d2 for Biomedical Imaging with >30,000,000-Fold NMR Signal Enhancement in Water." *Analytical Chemistry* 86 (12): 5601–5.
- Shults, C W. 1993. "Effect of Selegiline (deprenyl) on the Progression of Disability in Early Parkinson's Disease. Parkinson Study Group." *Acta Neurologica Scandinavica*. 146: 36–42.
- Slevin, John T, Greg A. Gerhardt, Charles D. Smith, Don M. Gash, Richard Kryscio, and Byron Young. 2010. "Improvement of Bilateral Motor Functions in Patients with Parkinson Disease through the Unilateral Intraputaminial Infusion of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor." *Journal of Neurosurgery* 113 (3): 216–22.
- Spatola, Marianna, and Christian Wider. 2014. "Genetics of Parkinson's Disease: The Yield." *Parkinsonism & Related Disorders* 20 (1): 35–8.
- Spiegel, EA, HT Wycis, M Marks, and A Lee. 1947. "Stereotactic Apparatus for Operations on the Human Brain." *Science* 106: 349–50.
- Svennilson, E, A Torvik, R Lowe, and L Leksell. 1960. "Treatment of Parkinsonism by Stereotatic Thermolesions in the Pallidal Region. A Clinical Evaluation of 81 Cases." *Acta Psychiatr Scand* 35: 358–77.
- Targosz-Gajniak, Magdalena G, Joanna S Siuda, Magdalena M Wicher, Tomasz J Banasik, Malgorzata A Bujak, Aleksandra M Augusciak-Duma, and Grzegorz Opala. 2013. "Magnetic Resonance Spectroscopy as a Predictor of Conversion of Mild Cognitive Impairment to Dementia." *Journal of the Neurological Sciences* 335 (1-2): 58–63.



Taylor, A, M McLean, P Morris, and H Bachelard. 1996. "Approaches to Studies on Neuronal/glia Relationships by ^{13}C -MRS Analysis." *Developmental Neuroscience* 18 (5-6): 434–42.

Thiruchelvam, M, B J Brockel, E K Richfield, R B Baggs, and D A Cory-Slechta. 2000. "Potentiated and Preferential Effects of Combined Paraquat and Maneb on Nigrostriatal Dopamine Systems: Environmental Risk Factors for Parkinson's Disease?" *Brain Research* 873 (2): 225–34.

Truong, Milton L, Aaron M Coffey, Roman V Shchepin, Kevin W Waddell, and Eduard Y Chekmenev. 2014. "Sub-Second Proton Imaging of ^{13}C Hyperpolarized Contrast Agents in Water." *Contrast Media & Molecular Imaging*, April. doi:10.1002/cmml.1579.

U

Ungerstedt, U. 1968. "6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons." *European Journal of Pharmacology* 5 (1): 107–10.

V

Villalba, Rosa M, and Yolanda Smith. 2011. "Neuroglial Plasticity at Striatal Glutamatergic Synapses in Parkinson's Disease." *Frontiers in Systems Neuroscience* 5 (January): 68.

Vuichoud, Basile, Jonas Milani, Aurélien Bornet, Roberto Melzi, Sami Jannin, and Geoffrey Bodenhausen. 2014. "Hyperpolarization of Deuterated Metabolites via Remote Cross-Polarization and Dissolution Dynamic Nuclear Polarization." *The Journal of Physical Chemistry. B* 118 (5): 1411–15.

W

Wakeman, D.R, D.E Jr Redmond, H.B Dodiya, J.R Jr Sladek, C Leranath, Y.D Teng, R.J Samulski, and E.Y Snyder. 2014. "Human Neural Stem Cells Survive Long Term in the Midbrain of Dopamine-Depleted Monkeys after GDNF Overexpression and Project Neurites toward an Appropriate Target." *Stem Cells Trans Med* 3 (6): 692–701.

Wang, Anthony, Sadie Costello, Myles Cockburn, Xinbo Zhang, Jeff Bronstein, and Beate Ritz. 2011. "Parkinson's Disease Risk from Ambient Exposure to Pesticides." *European Journal of Epidemiology* 26 (7): 547–55.

Wang, Feng, Yuan Cheng, Jie Mei, Yu Song, Yan-qing Yang, Yingjiang Liu, and Zhibiao Wang. 2009. "Focused Ultrasound Microbubble Destruction-Mediated Changes in Blood-Brain Barrier Permeability Assessed by Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging." *Journal of Ultrasound in Medicine* 28 (11): 1501–9.

Watanabe, H, H Fukatsu, M Katsuno, M Sugiura, K Hamada, Y Okada, M Hirayama, T Ishigaki, and G Sobue. 2004. "Multiple Regional ^1H -MR Spectroscopy in Multiple System Atrophy: NAA/Cr Reduction in Pontine Base as a Valuable Diagnostic Marker." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75 (1): 103–9.

Wiesinger, Florian, Eliane Weidl, Marion I Menzel, Martin A Janich, Oleksandr Khagai, Steffen J Glaser, Axel Haase, Markus Schwaiger, and Rolf F Schulte. 2012. "IDEAL Spiral CSI for Dynamic Metabolic MR Imaging of Hyperpolarized [$1-^{13}\text{C}$] Pyruvate." *Magnetic Resonance in Medicine* 68: 8–16.

Witte, Christopher, and Leif Schröder. 2013. "NMR of Hyperpolarised Probes." *NMR in Biomedicine* 26 (7): 788–802.

X

Xing, Yan, Galen D Reed, John M Pauly, Adam B Kerr, and Peder E Z Larson. 2013. "Optimal Variable Flip Angle Schemes for Dynamic Acquisition of Exchanging Hyperpolarized Substrates." *Journal of Magnetic Resonance* 234: 75–81.

Xu, Tao, Dirk Mayer, Meng Gu, Yi-Fen Yen, Sonal Josan, James Tropp, Adolf Pfefferbaum, Ralph Hurd, and Daniel Spielman. 2011. "Quantification of *in Vivo* Metabolic Kinetics of Hyperpolarized Pyruvate in Rat Kidneys Using Dynamic ¹³C MRSI." *NMR in Biomedicine* 24 (8): 997–1005.

Y

Yelnik, J. 2002. "Functional Anatomy of the Basal Ganglia." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 17(3): 15–21.

Yung, K K, J P Bolam, A D Smith, S M Hersch, B J Ciliax, and A I Levey. 1995. "Immunocytochemical Localization of D1 and D2 Dopamine Receptors in the Basal Ganglia of the Rat: Light and Electron Microscopy." *Neuroscience* 65 (3): 709–30.

Z

Zacharias, Niki M, Henry R Chan, Napapon Sailasuta, Brian D Ross, and Pratip Bhattacharya. 2012. "Real-Time Molecular Imaging of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolism *in Vivo* by Hyperpolarized 1-(¹³C) Diethyl Succinate." *Journal of the American Chemical Society* 134 (2): 934–43.

Zhou, Xin, Yanping Sun, Mary Mazzanti, Nils Henninger, Joey Mansour, Marc Fisher, and Mitchell Albert. 2011. "MRI of Stroke Using Hyperpolarized ¹²⁹Xe." *NMR in Biomedicine* 24 (2): 170–75.

Ziebell, Morten, Birgitte B Andersen, Gerda Thomsen, Lars H Pinborg, Merete Karlsborg, Steen G Hasselbalch, and Gitte M Knudsen. 2012. "Predictive Value of Dopamine Transporter SPECT Imaging with [¹²³I]PE2I in Patients with Subtle Parkinsonian Symptoms." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 39 (2): 242–50.



ANNEXES

Annexe 1

Echelle UPDRS (FAHN et ELTON, 1987)

Examineur :

Date : |_|_| |_|_| 20|_|_|

Patient :

UPDRS Partie I : ÉTAT MENTAL, COMPORTEMENTAL ET THYMIQUE

1 - Affaiblissement intellectuel

0 = Absent

1 = Léger. Manque de mémoire habituel avec souvenirs partiels des évènements sans autre difficulté.

2 = Perte mnésique modérée, avec désorientation et difficultés modérées de faire face à des problèmes complexes. Atteinte légère mais indiscutable de ses capacités fonctionnelles avec besoin d'une incitation occasionnelle de l'entourage. |__|

3 = Déficit mnésique grave avec désorientation dans le temps et souvent dans l'espace. Handicap grave face aux problèmes.

4 = Perte mnésique sévère uniquement préservation de sa propre orientation. Incapable de porter des jugements ou de résoudre des problèmes, demande beaucoup d'aide pour les soins personnels, ne peut être laissé seul.

2 - Troubles de la pensée (en rapport avec la démence ou une intoxication médicamenteuse)

0 = Aucun

1 = Rêves animés |__|

2 = Hallucinations bénignes critiquées

3 = Hallucinations occasionnelles ou fréquentes ou idées délirantes : non critiquées : peuvent gêner les activités quotidiennes.

4 = Hallucinations continues. Idées délirantes ou psychose expansive : incapable de prendre soin de lui-même.

3 - Dépression

0 = Absente

1 = Période de tristesse ou sentiment de culpabilité excessif ne persistant pas plusieurs jours ou semaines. |__|

2 = Dépression durable (une semaine ou plus).

3 = Dépression durable avec symptômes végétatifs (insomnie, anorexie, perte de poids, perte d'intérêt).

4 = Dépression durable avec symptômes végétatifs avec pensées ou intentions suicidaires.

4 - Motivation - Initiative

0 = Normale

1 = Moins franche qu'à l'habitude : plus passif. |__|

2 = Perte d'initiative avec désintérêt pour certaines activités non routinières.

3 = Perte d'initiative ou désintérêt dans les activités quotidiennes routinières.

4 = Absence d'initiative, perte totale d'intérêt.

UPDRS Partie II : ACTIVITES DANS LA VIE QUOTIDIENNE

ON OFF

(à déterminer en période L-Dopa ON)

5 - Parole

0 = Normale

1 = Légèrement perturbée, pas de difficulté à être compris. |__| |__|

2 = Modérément perturbée. On doit occasionnellement lui demander de répéter.

3 = Gravement perturbée. On doit lui demander fréquemment de répéter.

4 = Incompréhensible la plupart du temps.

6 - Salivation

0 = Normale

1 = Légère mais excès habituel de salive dans la bouche, peut baver pendant la nuit. |__| |__|

2 = Hypersialorrhée modérée. Peut baver un peu.

3 = Hypersialorrhée nette avec un peu bave.

4 = Écoulement habituel de bave nécessitant en permanence un mouchoir.

7 - Déglutition

0 = Normale

1 = S'étrangle rarement |__| |__|

2 = S'étrangle occasionnellement

3 = Nécessite une alimentation semi-liquide

4 = Nécessite une alimentation par forme gastrique ou une gastrostomie.

8 - Écriture

0 = Normale

1 = Légèrement ralentie ou micrographique.

|__| |__|

2 = Nettement ralentie ou micrographique

3 = Gravement perturbée : tous les mots ne sont pas lisibles.

4 = La majorité des mots est illisible.

9 - S'alimenter et manipuler les couverts

0 = Normale

1 = Un peu lent et maladroit mais n'a pas besoin d'être aidé.

|__| |__|

2 = Pour la plupart des aliments peut se débrouiller seul, quoique lent et maladroit.

3 = A besoin d'une aide pour les repas, mais peut encore s'alimenter lentement

4 = On doit lui donner à manger.

10 - Habillage

0 = Normal

1 = Un peu lent mais ne doit pas être aidé.

|__| |__|

2 = Aide occasionnelle pour boutonner, enfiler une manche.

3 = A besoin d'être très aidé mais peut faire certaines choses tout seul.

4 = Totalement dépendant.

11 - Hygiène

0 = Normale

1 = Un peu lent mais n'a pas besoin d'être aidé.

|__| |__|

2 = Nécessite une aide pour la douche ou le bain : ou très lent dans les soins hygiéniques.

3 = Nécessite une aide pour se laver, se brosser les dents, se coiffer et se baigner.

4 = Sonde urinaire ou autres aides mécaniques.

12 - Se retourner dans le lit et arranger les draps et couvertures

0 = Normal

1 = Un peu lent et maladroit mais n'a pas besoin d'être aidé.

|_| |_|

2 = Peut se retourner seul ou arranger les draps mais avec une grande difficulté.

3 = Peut commencer le geste mais n'arrive pas à se retourner ou arranger les draps seul.

4 = Dépendant.

13 - Chute non liée au piétinement

0 = Aucune

1 = Chutes rares

|_| |_|

2 = Chutes occasionnelles mais moins qu'une fois par jour.

3 = En moyenne, une chute par jour.

4 = Chutes pluriquotidiennes.

14 - Piétinement lors de la marche

0 = Aucun

1 = Rare piétinement lors de la marche, peut avoir une hésitation au départ.

|_| |_|

2 = Piétinement occasionnel lors de la marche.

3 = Piétinement fréquent entraînant occasionnellement des chutes.

4 = Chutes fréquentes dues aux piétinements.

15 - Marche

0 = Normale

1 = Difficultés légères mais peut balancer les bras ou traîne les pieds.

|__| |__|

2 = Difficultés modérées mais ne demande que peut ou pas d'aide.

3 = Difficultés importantes de la marche nécessitant une aide.

4 = Ne peut marcher du tout même avec une aide.

16 - Tremblement

0 = Absent

1 = Léger et rarement présent

|__| |__|

2 = Modéré, gênant le patient

3 = Important, gêne certaines activités.

4 = Marqué, gêne la plupart des activités.

17 - Troubles sensitifs subjectifs liés au parkinsonisme

0 = Aucun

1 = Occasionnellement engourdissement, picotements ou douleurs légères.

|__| |__|

2 = Engourdissement, picotements ou douleurs fréquentes : pas gênant.

3 = Sensations douloureuses fréquentes.

4 = Douleurs très vives.

TOTAL Partie II UPDRS

|__| |__|

UPDRS Partie III : EXAMEN MOTEUR

(à déterminer en période L-Dopa ON)

ON OFF**18 – Parole**| _|
|_|**19 - Expression faciale**

|_| |_|

-

|_| |_|

|_| |_| |_| |_|

|_| |_| |_| |_|

D - G D - G**21 - Tremblement d'action ou tremblement postural des mains**

|_| |_| |_| |_|

22 - Rigidité

(évaluée lors des mouvements

Cou |_| |_|

passifs des principales articulations,

avec un malade relâché en position

MSD-MSG |_| |_| |_| |_|

assise, ne pas tenir compte

|_| |_| |_| |_|

de la roue dentée)

MID-MIG

D - G D - G

23 - Tapotement des doigts (le malade fait des mouvements rapides et de grande amplitude du pouce sur l'index chaque main séparément)

|_| |_| |_| |_|

24 - Mouvements des mains (le malade ouvre et ferme les mains avec la plus grande amplitude possible, chaque main séparément)

|_| |_| |_| |_|

25 - Mouvements alternatifs rapides (mouvements de prosupination des mains verticalement ou horizontalement, avec la plus large amplitude possible, les deux mains simultanément)

|_| |_| |_| |_|

26 - Agilité de la jambe (le patient tape le talon sur le sol de façon rapide en soulevant tout le pied, l'amplitude doit être d'environ 7.5 cm)

|_| |_| |_| |_|

27 - Se lever d'une chaise (le patient assis essaie de se lever d'une chaise à dos en bois ou en métal, les bras pliés devant la poitrine)

|_| |_|

28 - Posture

|_| |_|

29 - Stabilité posturale (réponse à un déplacement postural soudain, produit par une poussée sur les épaules alors que le patient est debout, les yeux ouverts et les pieds légèrement

|_| |_|

écartés ; le patient doit être prévenu)

30 – Démarche

|__| |__|

31 - Bradykinésie corporelle ou hypokinésie (combinant la lenteur, l'hésitation, la diminution du ballant des bras, l'amplitude faible et la pauvreté des mouvements en général)

|__| |__|

TOTAL Partie III UPDRS

|__| |__|

UPDRS Partie IV - COMPLICATIONS DU TRAITEMENT

(au cours de la dernière semaine)

A – Dyskinésies

32 - Durée : durant quelle proportion de la journée les dyskinésies sont-elles présentes ?

(information tenue par l'interrogatoire).

|__|

0 = Aucune

3 = 51 à 75% de la journée

1 = 1 à 25% de la journée

4 = 76 à 100% de la journée

2 = 26 à 50% de la journée

|__|

33 - Incapacité : quelle incapacité entraîne des dyskinésies ?

0 = Aucune

3 = Sévère

1 = Légère

4 = Complète

2 = Modérée

34 - Dyskinésies douloureuses : les dyskinésies entraînent-elles des douleurs ?

0 = Aucune

3 = Sévère

|__|

1 = Légère

4 = Marquée

2 = Modérée

35 - Présence d'une dystonie matinale précoce (information tenue par l'interrogatoire)

|__|

0 = Non

1 = Oui

B - FLUCTUATIONS CLINIQUES

36 - Y-a-t-il des périodes OFF dont on peut prédire le moment après une prise médicamenteuse ?

|__|

0 = Non

1 = Oui

|__|

37 - Y-a-t-il des périodes OFF dont on ne peut prédire le moment après une prise

médicamenteuse ?

0 = Non 1 = Oui

38 - Est-ce que certaines des périodes OFF viennent soudainement (c'est à dire en quelques secondes) ?

|__|

0 = Non 1 = Oui

39 - Quelle est la proportion de la journée durant laquelle le patient est en moyenne en situation OFF ?

0 = Aucune

3 = 51 à 75% de la journée

|__|

1 = 1à 25% de la journée

4 = 76 à 100% de la journée.

2 = 26 à 50% de la journée

C - AUTRES COMPLICATIONS

40 - Le patient a-t-il de l'anorexie, des nausées, des vomissements ?

|__|

0 = Non 1 = Oui

41 - Le patient a-t-il des troubles du sommeil, par exemple insomnie ou somnolence excessive ?

|__|

0 = Non 1 = Oui

42 - Le patient a-t-il une hypotension orthostatique symptomatique ?

|_ |

0 = Non 1 = Oui

Annexe 2

Stade Hoehn et Yahr

	<u>ON</u>	<u>OFF</u>
Stade 0 : pas de signe de la maladie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 1 : maladie unilatérale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 1,5 : maladie unilatérale, plus atteinte axiale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 2 : maladie bilatérale sans trouble de l'équilibre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 2,5 : maladie bilatérale légère avec rétablissement lors du test de la poussée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 3 : maladie bilatérale légère à modérée : une certaine instabilité posturale, physiquement autonome	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 4 : handicap sévère : toujours capable de marcher ou de se tenir debout sans aide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stade 5 : malade en chaise roulante ou alité sauf s'il est aidé.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

