HAL
open science

# Modifications métaboliques lors de l'activation cérébrale : suivi par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13

Jordy Blanc

▶ **To cite this version:**

Jordy Blanc. Modifications métaboliques lors de l'activation cérébrale : suivi par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0336 . tel-02021400

**HAL Id: tel-02021400**

**https://theses.hal.science/tel-02021400v1**

Submitted on 15 Feb 2019

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

# DOCTEUR DE

# L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la vie et de la santé

SPÉCIALITÉ : Bio-imagerie

Par Jordy BLANC

# Modifications métaboliques lors de l'activation cérébrale : Suivi par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13

Sous la direction de : Anne-Karine Bouzier-Sore

Soutenue le 14 décembre 2018

Membres du jury:

| | |
|---|---|
| Dr Dominique Sappey-Marinier, MCU-PH, Créatis, Lyon | Rapporteur |
| Dr Julien Valette, Chercheur CEA, MIRCen, Fontenay-aux-Roses | Rapporteur |
| Dr Monique Bernard, DR CNRS, CRMBM, Marseille | Présidente |
| Dr Luc Pellerin, Professeur de l'Université de Lausanne | Invité |
| Dr Sylvain Miraux, DR CNRS, Directeur du CRMSB, Bordeaux | |
| Dr Anne-Karine Bouzier-Sore, CR CNRS, Directrice de thèse, CRMSB, Bordeaux | |

« … Sinon tu traines
Et tu dis que tu te reposes bien
Parce que tu mens
Tu vas, tu viens, tu reviens sur tes pas
Tu montes au sommet des monuments
Tu jouis trois-quatre fois par jour
Tu appelles ça faire l'amour

Ou bien tu vas au square au milieu des nounous
Tu vas t'asseoir entre deux poussettes à trois roues
Mater les bourgeoises qui s'entretiennent
Encore folles de leurs culs
Et disons fières
Celles qui se tiennent un petit peu en arrière
Avec leurs histoires de petits
Leurs histoires de psys
Les apéros party
Leurs souvenirs du samedi

Ne sois pas trop exigeant

Je vais au square où il y a des enfants qui me ressemblent
Je les regarde, et quand ils me sourient, je tremble
Ne t'habitue pas aux choses qui finissent
Et tu seras longtemps heureux mon fils

Le bonheur est à portée de main. »

Arnaud Fleurent-Didier
Ne sois pas trop exigeant (La reproduction, 2010)

# Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été effectuée dans le Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (CRMSB) à Bordeaux. Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Messieurs Jean-Michel Franconi et Sylvain Miraux qui se sont succédés en tant que directeur du Laboratoire pour l'accueil et le soutien qu'ils m'ont apportés lors de la réalisation de ce projet. Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail, et tout particulièrement Luc Pellerin sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Chacune des étapes de ce travail a été réalisée sous la supervision attentive et bienveillante d'Anne-Karine Bouzier-Sore. Qu'elle soit infiniment remerciée ici pour ses nombreux conseils, sa grande disponibilité et sa générosité. C'était placer la barre bien haut que de daigner endosser les conséquences de devenir ton premier doctorant, je ne regretterai jamais ce pied de nez à la passivité.

Champion n'est rien sans les triplettes de Belleville, un merci affectueux à Ursule, Hélène et Leslie pour m'avoir accordé leur confiance et ri à mes blagues. La co-habitation au sein du même bureau, votre assistance technique, les pauses-café peu diététiques, votre débonnaireté, votre soutien et vos bons conseils incarnent un élément clef à ma réussite.

Merci également à William Lefrançois de m'avoir accordé l'opportunité d'enseigner et accompagner durant deux années quelques jeunes étudiants dans les méandres des sciences. Noël Pinaud et Véronique Bouchaud ainsi que nos conversations me manqueront assurément, je voudrais m'épancher et leur attribuer ma profonde affection.

Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré à ces travaux, Philippe Massot pour la conception du boitier de commande automatique du paradigme d'activation, Marc Biran pour sa patience, sa pédagogie et son aide en RMN HRMAS, Stéphane Sanchez pour sa bonne humeur et l'attention particulière portée à mes données grégaires ambulantes et Karine Viaud pour son efficacité et sa disponibilité à toute épreuve.

Grâce à la mise en commun des énergies, des enthousiasmes, des capacités, les doctorants du CRMSB ne connaissent pas l'isolement dont souffrent tant de jeunes chercheurs. J'ai clairement trouvé auprès d'eux un soutien et une émulation intellectuelle qui ont grandement allégé les difficultés rencontrées en chemin. Une pensée particulière à Samuel Bonnet avec qui comme deux dealers dans une cellule de sécu ou deux militaires dans un congrès de gauchistes, nous avons su aboutir à l'atteinte des objectifs du projet sans couper de virages.

Je tiens surtout à remercier ma meilleure confidente, mon pilier, mon amoureuse, Fatoumata N'gningue pour son soutien constant et pour l'infatigable patience dont elle a fait preuve durant ces années, à la fois durant toute la période de recherche et surtout pendant la rédaction de cette thèse.

Je dédie enfin cette thèse à mes parents et mon frère qui resteront pour moi un soutien indéfectible et je leur dois d'être ce que je suis aujourd'hui.

# Table des matières

Abréviations et notations ..... 1
Liste des publications et communications ..... 3

Chapitre 1. Introduction ..... 5

1. Problématique ..... 5
2. Introduction au métabolisme du système nerveux central ..... 9
3. Arguments en faveur de l'ANLS ..... 11
4. Arguments en défaveur de l'ANLS ..... 13
5. Intérêt de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ..... 15
   5.1. Concepts de base de la RMN ..... 15
   5.2. Spectroscopie RMN du proton *in vivo* ..... 17
   5.3. Spectroscopie RMN du $^{13}C$ *ex vivo* ..... 23

Chapitre 2. Matériels et méthodes ..... 25

1. Modèle d'activation ..... 25
2. Installation, réglages et acquisitions ..... 26
   2.1. Animaux ..... 26
   2.2. Anesthésie ..... 27
   2.3. Positionnement du rat dans l'aimant ..... 28
   2.4. Système d'air pulsé pour la stimulation des vibrisses ..... 29
   2.5. Installation de l'antenne surfacique (Spectroscopie RMN du proton) ..... 30
   2.6. Installation de l'antenne tête (IRM fonctionnelle) ..... 31
   2.7. Paramètres utilisés en spectroscopie de RMN du proton ..... 32
   2.8. Paramètres utilisés en IRM fonctionnelle ..... 33
3. Paradigme ..... 34
4. Résultats des quantifications BOLD sur les rats contrôles ..... 37
5. Résultats de spectroscopie sur les rats contrôles ..... 41
   5.1. Pipeline pour quantification des spectres PRESS ..... 41
   5.2. Comparaison PRESS Vs LASER ..... 44
   5.3. Comparaison des antennes de surface (7 mm Vs 10 mm) ..... 46
   5.4. Comparaison des différents paramètres séquence LASER ..... 48
   5.5. Etude cinétique du lactate sous isoflurane ..... 50

Chapitre 3. Etude *in vivo* sur les rats MCTs ..... 51

1. Modèles de rats modifiés génétiquement ..... 51
2. Résultats d'IRMf pour les rats UNIV, MCT2, MCT4 et MCT1-4 ..... 54
3. Résultats de SRM fonctionnelle *in vivo* ..... 57
   3.1. Lactate ..... 57
   3.2. N-acétyl-aspartate et N-acétyl-aspartyl-glutamate ..... 60
   3.3. Glutamine et Glutamate ..... 61
4. Expérience de « rescue » ..... 62

Chapitre 4. Etude *ex vivo* sur les rats MCTs ..... 66

1. Protocole de contention des rats ..... 66
2. Protocole de stimulation des vibrisses ..... 66
3. Protocole d'extraction perchlorique ..... 67
4. Séquences utilisées ..... 67
   4.1. Spectroscopie RMN $^{1}$H ..... 67
   4.2. Spectroscopie RMN $^{13}$C ..... 68
   4.3. Edition hétéronucléaire: séquences POCE ..... 70
5. Devenir du [1-$^{13}$C]glucose ..... 70
6. Résultats ..... 72
   6.1. Enrichissements spécifiques ..... 72
   6.2. Enrichissements relatifs ..... 73

Chapitre 5. Discussion et perspectives ..... 74

1. Discussion ..... 74
2. Critiques et perspectives ..... 78

Bibliographie ..... 80

# Abréviations et notations

| | |
|---|---|
| 2DG | 2-déoxyglucose |
| $^{1}H$ | Proton |
| $^{13}C$ | Carbone 13 |
| FDG | $^{18}$fluoro-2désoxyglucose |
| ANLSH | Astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| ATP | Adénosine triphoshpate |
| $B_0$ | Champ magnétique statique |
| $B_1$ | Champ magnétique variable |
| BOLD | Blood oxygenation level dependent |
| BW | Bande passante |
| CBF | Flux sanguin cérébral |
| $CMR_{O2}$ | Consommation d'oxygène cérébral |
| Cr | Créatine |
| CRLB | Cramér-Rao lower bounds |
| $\delta$ | Déplacement chimique |
| FAD | Flavine adénine dinucléotide |
| FID | Free induction decay |
| $\gamma$ | Rapport gyromagnétique |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GLAST | Glutamate aspartate transporter |
| Gln | Glutamine |
| GLT-1 | Glutamate transporter 1 |
| Glu | Glutamate |
| GPC | Glycéro-phospho-choline |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| Ins | Inositol |
| $IP_3$ | Inositol triphosphate |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique |
| IRMf | Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle |
| LASER | Localization by adiabatique selective refocusing |
| LDH | Lactate déshydrogénase |
| LW | Largeur à mi-hauteur des pics |
| MCT | Transporteurs de monocarboxylates |
| NAA | N-acétyl-aspartate |
| NAAG | N-acétyl-aspartyl-glutamate |
| NAD | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADH | Hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide |
| OVS | Outer volume saturation |
| PCh | Phospho-choline |
| PCr | Phosphocréatine |

| | |
|---|---|
| PDH | Pyruvate déshydrogénase |
| Pi | Phosphate Inorganique |
| ppm | Partie par million |
| PRESS | Point resolved spectroscopy |
| Pyr | Pyruvate |
| RF | Radiofréquence |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| ROI | Région d'intérêt |
| ROS | Espèces réactives oxygénées |
| SRM | Spectroscopie par résonance magnétique |
| STEAM | Stimulated echo acquisition mode |
| SVS | Single voxel spectroscopy |
| $T_1$ | Temps de relaxation longitudinal |
| $T_2$ | Temps de relaxation transverse |
| Tau | Taurine |
| tCho | Choline totale |
| tCr | Créatine totale |
| TE | Temps d’écho |
| TEP | Tomographie par émission de positrons |
| TF | Transformée de Fourier |
| TR | Temps de répétition |

# Liste des publications et communications

## Articles à comité de lecture

Publications issues de cette thèse

1. **J. Blanc**, H. Roumes, L. Mazuel, P. Massot, G. Raffard, M. Biran, A.K. Bouzier-Sore. Localized-proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional magnetic resonance imaging in the rat barrel cortex during whisker activation. JOVE 2018. *(accepté)*
2. **J. Blanc**, C. Jollé, C. Repond, H. Roumes, P. Massot, G. Raffard, N. Déglon, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore. Role of the monocarboxylate transporters in the functional MRS and MRI responses. *(en cours d'écriture)*

Autres publications

1. L. Mazuel, **J. Blanc**, C. Repond, V. Bouchaud, G. Raffard, N. Déglon, G. Bonvento, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore. A neuronal MCT2 knockdown in the rat somatosensory cortex reduces both the NMR lactate signal and the BOLD response during whisker stimulation, PLoS One, 12 (2017) e0174990.
2. Y. Crémillieux, U. Dumont, L. Mazuel, R. Salvati, V. Zhendre, S. Rizzitelli, **J. Blanc**, H. Roumes, N. Pinaud, A.K. Bouzier-Sore. Online quantification of lactate concentration in microdialysate during cerebral activation using $^{1}$H-MRS and sensitive NMR microcoil. Frontiers in cellular neuroscience *(Soumis)*
3. H. Roumes, U. Dumont, S. Sanchez, L. Mazuel, **J. Blanc**, G. Raffard, J.F. Chateil, A.K. Bouzier-Sore. Lactate, a new hope against brain damages in neonatal hypoxia-ischemia Science translational research *(Soumis)*

## Communications orales

Communications internationales

1. POSTER : **J. Blanc**, L. Mazuel, H. Roumes, S. Sanchez, M. Biran, J.M. Franconi, J.F. Chateil, A.K. Bouzier-Sore. Knowledge upgrade on the lactate role in the central nervous system: Involvement in cerebral activation to the shRNA-control and shMCT2 rats. International Symposium on Metabolic and redox interactions between neurons and astrocytes in health and disease, Salamanca, 2017.
2. ORALE : **J. Blanc**, C. Jollé, L. Mazuel, H. Roumes, N. Déglon, G. Bonvento, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore. Study of the variations in lactate levels during in vivo whisker stimulation BY Functional MRI and localized 1H MRS: comparative study between control and shMCT2 rats. European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology (ESMRMB), Barcelona, 2017.

3. E-POSTER & POWER PITCH : **J. Blanc**, C. Jollé, H. Roumes, N. Déglon, L. Pellerin, and A.K. Bouzier-Sore. Importance of the lactate shuttle for brain activation: An *in vivo* localized $^{1}$H-MRS and functional MRI study during whisker stimulation. International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM), Paris, 2018.

Communications nationales

1. ORALE : **J. Blanc**, L. Mazuel, S. Sanchez, M. Biran, A.K. Bouzier-Sore. Etude *in vivo* des variations de concentration de lactate durant l'activation cérébrale : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton. Journée fédération FR Tecsan, Bordeaux, 14/06/2016.
2. POSTER : **J. Blanc**, L. Mazuel, G.Raffard, N.Alberti, S.Sanchez, J.M. Franconi, J.F. Chateil, A.K. Bouzier-Sore. Knowledge upgrade on the lactate role in the central nervous system: Involvement in cerebral activation in the healthy brain and in neuroprotection in a model of neonatal hypoxic-ischemic injury. Journée Labex TRAIL, Bordeaux, 07/07/2016.
3. POSTER : **J. Blanc**, C. Jollé, H. Roumes, N. Déglon, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore. Study of metabolic responses during neuronal activation: A functional MRI and Localized 1H MRS study. Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine (SFRMBM), Bordeaux, 2017.
4. ORALE : **J. Blanc**, L. Mazuel, G. Raffard, N. Déglon, G. Bonvento, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore. Modifications métaboliques lors de l'activation cérébrale : Suivi par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 *ex vivo* et *in vivo*. Journée fédération FR Tecsan, Bordeaux, 22/06/2017.

## Distinctions

Obtention d'une bourse de la société française de résonance magnétique en biologie & médecine (SFRMBM) et France Life Imaging (FLI) pour les travaux scientifiques et participation à la conférence conjointe de l'ESMRMB-ISMRM 2018 à Paris.

➔ Magna Cum Laude award pour la contribution scientifique "Importance of the lactate shuttle for brain activation: an *in vivo* localized 1H-MRS and functional MRI study during whisker stimulation".

# Chapitre 1. Introduction

## 1. Problématique

Le cerveau humain est constitué d'environ $10^{11}$ neurones et environ deux fois plus de cellules gliales selon les régions [1]. Ces dernières jouent le rôle de « baby-sitter » du tissu nerveux et assurent un apport en nutriments ainsi qu'en oxygène. Elles maintiennent l'homéostasie ionique et métabolique, produisent la myéline, combattent les pathogènes et suppriment les cellules mortes.

Le cerveau correspond (chez l'homme adulte moyen) à 2 % du poids total du corps humain et consomme jusqu'à 20 % du dioxygène et 25 % du glucose circulant au repos [2]. D'un point de vue métabolique, ses besoins énergétiques sont conséquents et globalement constants malgré les fluctuations importantes d'activités mentales et motrices [3]. L'utilisation croissante de techniques d'imagerie modernes telles que la tomographie par émission de positrons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) pour étudier les fonctions du cerveau humain vivant est essentielle pour en comprendre les mécanismes.

**L'objectif majeur de ce travail est de comprendre quels substrats sont utilisés par les neurones lors de l'activité cérébrale**.

Dans un premier temps, revenons sur les travaux de Fox et Raichle de 1984 [4]. L'objectif de leur étude était de déterminer la relation entre les répétitions d'un stimulus sensoriel simple (stimulus visuel) et le débit sanguin cérébral dans les différentes régions du cerveau humain. La molécule $H_2{}^{15}O$ administrée par voie intraveineuse comme traceur a été utilisée pour toutes les mesures du flux sanguin cérébral (CBF) durant les expériences de TEP. La région anatomique présentant la réponse aux stimuli la plus intense était localisée pour tous les sujets dans le lobe occipital, le long de la scissure calcarine, c'est-à-dire dans le cortex visuel primaire. La variation du débit sanguin dans cette région a mis en évidence pour la première fois par imagerie, un couplage entre activité cérébrale et vasodilatation des vaisseaux sanguins dans la zone stimulée : c'est le couplage neuro-vasculaire, décrit par le docteur Angelo Mosso dès 1888.

L'énergie fournie au cerveau par les substrats énergétiques est largement utilisée pour maintenir la transmission synaptique. Chez l'adulte, le substrat majoritaire est le glucose sanguin. À l'état de repos, l'énergie est fournie au cerveau par l'oxydation de ce glucose qui peut être résumée par l'équation suivante :

$$\mathbf{1\ C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O} \qquad \textit{(EQ1)}$$

Cette oxydation complète *via* la glycolyse puis le cycle de Krebs permet de fournir l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) aux cellules : 1 molécule de glucose oxydée

produisant alors (si le rendement est maximum) 38 molécules d'ATP (voir plus loin). Puisqu'un couplage neuro-vasculaire existe, et puisque les substrats essentiels du cerveau sont le glucose et le dioxygène apportés tous les deux par la circulation sanguine, on devine assez vite qu'il y aura également un couplage neuro-métabolique lors de l'activité synaptique. Cette hypothèse a d'ailleurs été émise dès 1890 par Roy et Sherrington [5]. Il faudra attendre 90 ans pour voir Sokoloff et ses collaborateurs démontrer que la consommation du glucose augmente avec l'activité cérébrale (technique d'autoradiographie utilisant le ($^{14}C$) désoxyglucose et des stimuli visuels chez le sujet) [6]. Durant l'activation cérébrale, l'augmentation de l'apport en glucose et en dioxygène est rendue possible par l'augmentation du CBF, et il existe en effet un couplage étroit entre activité synaptique, débit sanguin cérébral et consommation de glucose. Cela signifie donc que lors d'une activation cérébrale, un schéma de "changement métabolique" apparait, ce qui avait été mis en évidence par Sokoloff. Fox et Raichle vont aller plus loin dans la définition de ces "changements métaboliques" mis en place lors de l'activité cérébrale. Ils ont confirmé dans des études par TEP que l'activation cérébrale entraînait une augmentation parallèle du débit sanguin et de la consommation de glucose, mais, de façon surprenante, ils ont mis en évidence que l'augmentation de la consommation d'oxygène était bien moins prononcée [7]. Dans leurs expériences, Fox et Raichle, ainsi que leurs collaborateurs, ont quantifié la vitesse de consommation du glucose par le cerveau ($CMR_{glu}$ – cerebral metabolic rate of glucose), celle du dioxygène ($CMRO_2$) ainsi que le CBF, par TEP. Toutes leurs mesures ont été effectuées soit au repos, soit lors d'une stimulation visuelle. Le CBF et le $CMRO_2$ ont été mesurés dans un groupe de cinq sujets puis le CBF et $CMR_{glu}$ ont été mesurés dans un deuxième groupe de cinq sujets, dans le cortex visuel.

| $\mu mol.min^{-1}.100g^{-1}$ | **Cerveau entier à l'état de repos** | **Cortex visuel à l'état de repos** |
|---|---|---|
| **$CMR_{O2}$** | 1,50 ± 0,07 | 1,71 ± 0 ,18 |
| **$CMR_{glu}$** | 0,37 ± 0,05 | 0,42 ± 0,03 |

*Tableau 1: Valeurs des $CMR_{O2}$ et $CMR_{glu}$ dans le cerveau entier et dans le cortex visuel à l'état de repos.*

Chez tous les sujets, le $CMR_{glu}$ et le CBF du cortex visuel ont été nettement augmentés par la stimulation visuelle. Une augmentation moyenne de 0,21 ± 0,03 $\mu mol.min^{-1}.100g^{-1}$ a été mesurée pour la $CMR_{glu}$, soit 50 % d'augmentation par rapport à la valeur basale. Une augmentation de 50 % a également été observée pour le CBF lors de cette activation cérébrale. En revanche, une augmentation moyenne de 0,08 ± 0,19 $\mu mol.min^{-1}.100g^{-1}$ a été mesurée pour le $CMRO_2$, ce qui correspond à une augmentation moyenne de seulement 5 %. Ces résultats indiquent un découplage entre consommation de glucose et consommation de dioxygène lors de l'activité cérébrale. Ce phénomène de découplage entre CBF/$CMR_{glu}$ et $CMRO_2$ a mené à la découverte de l'IRMf [8]. En effet, revenons à l'équation de l'oxydation complète du glucose qui théoriquement est la suivante :

$$\mathbf{1\ C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O} \qquad \textit{(EQ1)}$$

Nous avons vu que la consommation de dioxygène, contrairement à celle du glucose, n'augmentait que très peu lors de l'activité cérébrale dans les expériences de Fox et Raichle.

Le débit sanguin local quant à lui augmente également. Il en résulte donc un apport local plus important en sang oxygéné, apport supérieur à la demande. En effet, bien que le cerveau soit activé, il y aura dans la zone stimulée une concentration plus importante d'oxyhémoglobine comparée à celle en désoxyhémoglobine. En 1936, Pauling et ses collaborateurs ont découvert une différence de propriétés magnétiques entre l'oxyhémoglobine (hémoglobine oxygénée) et la désoxyhémoglobine (hémoglobine désoxygénée, avec par conséquent un atome de fer isolé qui la rend paramagnétique, et qui modifie donc le champs magnétique et le rend localement inhomogène, produisant une perte de signal) [9]. Des mesures du débit sanguin avaient été enregistrées par IRM avec du Gadolinium (traceur exogène) par Belliveau et ses collaborateurs en 1990 [10]. La même année, l'utilisation du sang comme traceur endogène a permis à Ogawa et ses collaborateurs de montrer l'effet de la désoxyhémoglobine sur le contraste $T_2^*$ et, dans la continuité, d'effectuer la première image BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) sur le cerveau du rat [8]. En 1992, Kwong et ses collaborateurs enregistrent la première image BOLD sur le cerveau humain [11].

Le métabolisme énergétique cérébral est considéré comme essentiellement aérobie, le glucose et le dioxygène constituant ses principaux (et vitaux) substrats. À la lecture de ce qui a été décrit ci-avant, la question que nous pouvons nous poser est : où est utilisé le dioxygène ? Pourquoi sa consommation n'augmente pas de la même manière que celle du glucose lors de l'activation cérébrale ? La glycolyse est-elle aérobie ou anaérobie au cours de l'activité neuronale ? Plusieurs questions en fait...

Pour y répondre, un rappel de base du métabolisme du glucose est nécessaire. Le glucose, lors de son oxydation complète, subit principalement deux grandes séries de réactions biochimiques : la première, la glycolyse, permet la transformation d'une molécule de glucose à 6 atomes de carbone en deux molécules de pyruvate (3 carbones) et se résume avec le bilan suivant :

**Glycolyse:** $\mathbf{1\ C_6H_{12}O_6 + 2\ NAD^+ + 2P_i + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_3H_4O_3 + 2\ NADH{+}H^+ + 2\ ATP}$ ***EQ2***

La glycolyse a lieu dans le cytosol de la cellule. Par la suite, le pyruvate est soit transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) dans le cytosol, soit en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) à l'intérieur de la mitochondrie où a lieu la seconde série de réactions biochimiques de l'oxydation du glucose : le cycle de Krebs.

**LDH :** $\mathbf{2\ pyruvate + 2\ NADH{+}H^+ \leftrightarrow 2\ lactate + 2\ NAD^+}$ ***EQ3***

On s'aperçoit que par cette voie la transformation du pyruvate en lactate permet la reconversion en parallèle du NADH produit lors de la glycolyse en $NAD^+$, ce qui permettra alors à la glycolyse de pouvoir continuer.

**PDH :** $\mathbf{2\ Pyr + 2\ NAD^+ + HS\text{-}CoA \rightarrow 2\ acétyl\text{-}CoA + 2\ NADH + CO_2}$ ***EQ4***

L'acétyl-CoA peut alors continuer sa route dans le cycle de Krebs dont le bilan est :

**Cycle de Krebs :** $$2\ \text{acétyl-CoA} + 4\ H_2O + 6\ NAD^+ + 2\ FAD + 2\ GDP + 2P_i \rightarrow 4\ CO_2 + 6\ NADH{+}H^+ + 2\ FADH_2 + 2\ GTP + 4H^+ + Co \qquad \textit{EQ5}$$

Les NADH et $FADH_2$ produits lors de toutes ces réactions seront ensuite utilisés par la chaîne respiratoire pour créer de la force proton motrice et synthétiser de l'ATP. Au final, l'oxydation d'une molécule de glucose donne en théorie 38 ATP. Ce qui est intéressant, c'est que la glycolyse ne nécessite pas d'oxygène et la retransformation du pyruvate en lactate permet d'avoir un métabolisme du glucose sans consommation d'oxygène. Ce point est important pour comprendre les résultats obtenus et le découplage entre consommation de glucose et consommation d'oxygène observé par Fox et Raichle lors de stimulations visuelles. Le glucose serait-il consommé principalement par la glycolyse lors de l'activité neuronale ? La question clé et non résolue est la suivante : dans quel type cellulaire aurait lieu cette glycolyse ? Les neurones ou les astrocytes ? (***Figure 1***).

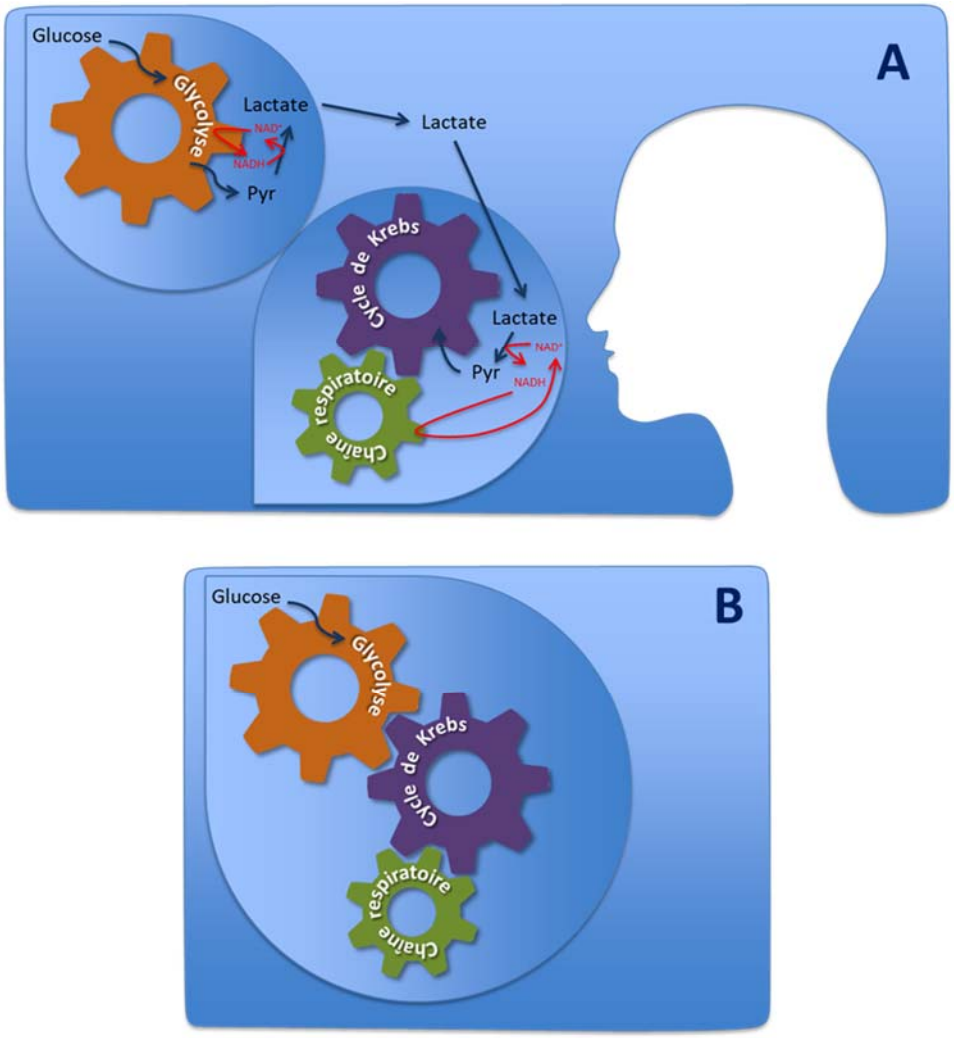



***Figure 1 : Mise en évidence du découplage métabolique. (A) représentation du métabolisme du glucose à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et les oxydations phosphorylantes (EQ1). (B) Cas particulier du cerveau : le métabolisme du glucose se fait en deux étapes, séparée physiquement: la glycolyse dans un type cellulaire (EQ 2 + 3), puis le métabolisme oxydatif dans un autre type cellulaire (EQ 3 + 4 + 5 + oxydations phosphorylantes).***

## 2. Introduction au métabolisme du système nerveux central

Dès le début des années 90, les premières expériences de spectroscopie *in vivo* fonctionnelles ont été réalisées [12, 13]. Contrairement aux expériences de TEP ou d'IRMf, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN $^{1}H$) a permis d'obtenir des spectres de métabolite dans une zone de cerveau activée. L'acquisition des spectres a été réalisée dans le cortex visuel soit au repos, soit pendant une série de stimulations lumineuses intermittentes. Dans le travail de Prichard, un groupe de cinq personnes a été analysé et une augmentation de la concentration de lactate a été mesurée pour chacune de ces personnes, l'augmentation variant de 130 à 190 % [12]. En 1992, Dominique Sappey-Marinier et ses collaborateurs ont également utilisé la spectroscopie $^{1}H$ et $^{31}P$ afin d'observer les variations de concentrations de lactate et de phosphate suite à des stimulations photiques du cortex visuel chez six volontaires sains. Ils ont enregistré une augmentation significative de 250 % en moyenne de la concentration de lactate dans les 6,4 minutes que durait le premier stimulus. En parallèle, les rapports PCr/Pi (Phosphocréatine / phosphate inorganique) diminuaient de manière significative par rapport aux valeurs contrôles. Quant au pH, il avait une légère tendance à augmenter, mais de façon non significative. Ces deux études concluent que leurs résultats viennent corroborer les études de Fox et Raichle et le découplage entre activité cérébrale et consommation d'oxygène. En effet, comme expliqué dans la première partie, la transformation de pyruvate en lactate permet de maintenir le métabolisme du glucose *via* la glycolyse, et ce sans consommation d'$O_2$ (dans un premier temps tout du moins). Savoir pourquoi ce découplage se met en place lors de l'activité synaptique et dans quel compartiment cellulaire il a lieu restent cependant des questions non résolues... Il faut toutefois souligner que Sappey-Marinier et ses collaborateurs écrivent dans la discussion: "*This apparent small increase in pH is especially important considering the marked rise in lactate, which might be expected to cause acidosis. One possible cause of alkalosis is the sharp increase in blood flow (Fox et al., 1988), which should reduce the Pco2 in the visual cortex. An alternative explanation for these findings is that PS* (photic stimulation) ***increased the rate of Na,KATPase activity*** *leading to increased ADP concentrations. A rise in ADP will shift the creatine kinase reaction in the direction of ATP synthesis, causing the observed fall in PCr and also increasing the intracellular pH because this reaction utilizes H+. The failure of this pH increase to become statistically significant is probably because of buffering by an increase lactic acid production (...)*". Il en ressort donc pour la première fois l'idée qu'une activation cérébrale stimulerait la $Na^{+}/K^{+}$ ATPase, ceci provoquant une consommation d'ATP, ce qui favoriserait sa resynthèse *via* la dégradation de la PCr (mesurée par Sappey-Marinier) par la réaction de la phosphocréatine kinase.

Ce n'est pourtant qu'en 1994 que le rôle important de cette $Na^{+}/K^{+}$ ATPase dans le métabolisme énergétique cérébral a été montré, rôle considéré comme majeur même dans ce qui a été décrit comme la navette lactate entre neurones et astrocytes, appelée ANLSH (astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis), par Pellerin et Magistretti (***Figure 2***). Suite à une expérience réalisée sur des astrocytes *in vitro*, ils ont montré que lorsque du glutamate, neurotransmetteur, était additionné au milieu de culture, les astrocytes augmentaient leur

consommation de glucose et leur production de lactate, ce dernier étant relargué dans le milieu [14]. Les blocages, soit du transporteur au glutamate astrocytaire, soit de la pompe $Na^+/K^+$ ATPase, supprimaient tous les deux ces effets. Ces résultats sont à l'origine de l'ANLSH : lors d'une activation neuronale, le glutamate libéré dans la fente synaptique est capturé par l'astrocyte par les transporteurs au glutamate (glutamate transporter 1, GLT1 et Glutamate aspartate transporter, GLAST) en co-transport avec le $Na^+$. Cela entraîne une augmentation de la concentration de $Na^+$ dans l'astrocyte. L'équilibre intracellulaire en $Na^+$ est rétabli par l'activation de la pompe $Na^+/K^+$ ATPase, qui consomme de l'ATP et va activer la glycolyse (qui produit 2 ATP, voir ***EQ2***), entrainant ainsi la production de lactate astrocytaire (afin de rétablir l'équilibre d'oxydo-réduction par la resynthèse de $NAD^+$, ***EQ3***) qui sera par la suite transféré aux neurones et utilisé comme substrat énergétique (transformation en pyruvate par la LDH qui est réversible, ***EQ3***, puis en acétyl-CoA, ***EQ4***, qui sera finalement oxydé par le cycle de Krebs neuronal, ***EQ5***). Cette hypothèse permet d'expliquer les résultats précédemment présentés et surtout le découplage existant entre consommation de glucose et de dioxygène : le glucose est bien le substrat sanguin essentiel pour le cerveau, son oxydation est bien complète mais cela se passerait en deux temps : le glucose serait d'abord métabolisé par la glycolyse (sans dioxygène donc) dans le compartiment astrocytaire, puis le lactate, produit à l'issu de la glycolyse, serait dans un second temps transféré aux neurones pour y être oxydé. Cette hypothèse, d'abord passée inaperçue, va par la suite secouer le petit monde de l'énergétique cérébrale...

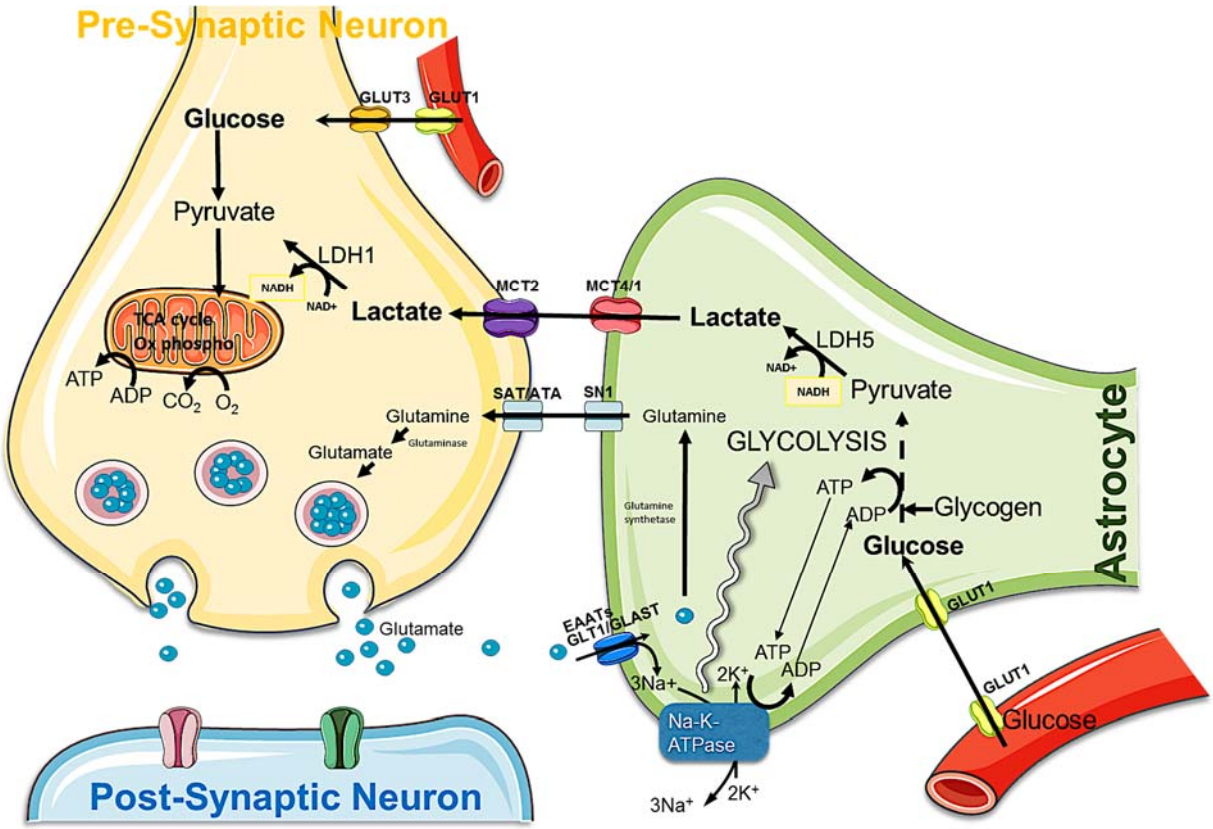



***Figure 2 : ANLSH (Astrocyte Neuron Lactate Shuttle Hypothesis). Adapté de Pellerin et Magistretti, PNAS, 1994.***

## 3. Arguments en faveur de l'ANLS

La navette lactate entre astrocytes et neurones fait intervenir différents partenaires clés, qui ont été identifiés au fil des années. Parmi les acteurs importants, on retrouve les transporteurs de monocarboxylates (MCT). Ils co-transportent le lactate (et les corps cétoniques) avec un proton. Différentes isoformes existent et ont été étudiées. Dans le cerveau, elles s'expriment de façon sélective selon le type cellulaire : MCT1 et MCT4 se retrouvent sur les astrocytes et MCT2 sur les neurones. Les cellules endothéliales quant à elles expriment l'isoforme de type 1. Les affinités de ces différentes isoformes ne sont pas identiques. Celle de MCT2 pour le lactate est plus élevée (Km = 0,5-0,75 mM) que celle de MCT1 (Km = 3,5-10 mM) et que celle de MCT4 (Km = 22-28 mM), soit une affinité de MCT2 pour le lactate environ 10 et 40 fois plus grande que celles de MCT1 et 4 pour ce même substrat, respectivement [15, 16]. Sachant que la concentration extracellulaire cérébrale du lactate est de 1 à 2 mM [17], les valeurs de ces paramètres cinétiques sont donc en faveur d'une entrée de lactate dans les neurones.

Un second acteur clé de cette navette est l'enzyme qui permet la conversion de lactate en pyruvate, la LDH. Cette enzyme travaille à l'équilibre et la réaction qu'elle catalyse est réversible. Il existe également différentes isoformes de LDH qui ont différents $K_m$ et $V_m$ pour le lactate. L'isoforme de type 1 est retrouvée de manière prédominante dans les neurones et ses propriétés cinétiques sont en faveur de la formation de pyruvate (la LDH1 est l'isoforme présente dans le tissu cardiaque également). À l'inverse, les astrocytes expriment de manière plus abondante la LDH5 dont les caractéristiques cinétiques sont en faveur de la formation de lactate (isoforme que l'on retrouve dans le muscle squelettique également).

Ces compartimentations des différentes isoformes des MCTs et LDHs ainsi que leurs différentes constantes cinétiques sont donc en faveur d'un transfert de lactate facilité de l'astrocyte vers le neurone, et donc en faveur de l'ANLS dans laquelle le glucose, transformé en lactate dans l'astrocyte à l'issu de la glycolyse, est transféré aux neurones, où il est converti en pyruvate, entre dans le cycle de Krebs sous forme d'acétylcoA et est utilisé comme carburant énergétique.

Les transporteurs au glutamate astrocytaires sont également centraux dans cette hypothèse (GLAST et GLT-1). En effet, selon le schéma de l'ANSL, c'est la recapture du Glu par l'astrocyte qui déclencherait l'augmentation de glycolyse dans l'astrocyte. En 2001, une étude *in vivo* a été réalisée afin de déterminer si le transporteur au glutamate astrocytaire nommé GLAST était impliqué dans le couplage neuro-métabolique [18]. Les expériences menées visaient à enregistrer la capture de 2-désoxyglucose radioactif ($^{14}$C-2-désoxyglucose, 2DG, non métabolisable) dans le cortex somatosensoriel comme mesure de la consommation de glucose lors de l'activation de cette zone par stimulation des vibrisses de rat. La mise en mouvement des vibrisses a permis d'observer une augmentation d'accumulation de la radioactivité dans la zone cérébrale activée comparée à l'état de repos, montrant le couplage neuro-métabolique chez les animaux contrôles. Aucune différence d'accumulation de radioactivité entre état activé et état de repos n'a pu en revanche être mesurée lorsque la

même expérience a été réitérée dans un groupe de rats dont le transporteur GLAST avait été réprimé dans le cortex somatosensoriel (approche anti-sens) [18]. Cette expérience a permis de montrer que les transporteurs gliaux de glutamate sont des composants moléculaires clés de ce couplage et que la recapture du glutamate par l'astrocyte suite à l'activité glutamatergique neuronale est essentielle pour l'énergétique cérébrale. Voutsinos-Porche et ses collaborateurs ont par la suite trouvé le même résultat mais cette fois chez la souris transgénique, KO soit pour le transporteur GLAST, soit pour GLT-1 [19]. Sans ces transporteurs au glutamate astrocytaires, la réponse d'augmentation du signal de capture du 2DG par autoradiographie lors de la stimulation des vibrisses était perdue. Ces résultats montrent clairement le couplage métabolique qui se produit entre neurones et astrocytes dans le cortex somatosensoriel, et le rôle primordial de ces transporteurs au glutamate gliaux dans ce couplage.

Dans l'ANLSH, le découplage métabolique décrit propose que l'astrocyte serait plutôt glycolytique, avec comme substrat majeur le glucose, alors que le neurone serait plutôt oxydatif, avec le lactate comme substrat important. Cet aspect de la navette a pu être vérifié, du moins *in vitro*, grâce à des études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN $^{13}C$). En 2003, Bouzier-Sore et ses collaborateurs ont réalisé une compétition de glucose et de lactate dans des cultures neuronales primaires [20, 21]. L'approche par spectroscopie de RMN $^{13}C$ a en effet permis de suivre le devenir de chacun de ces métabolites grâce à leur marquage alternatif ([1-$^{13}C$] glucose + lactate ou glucose + [3-$^{13}C$] lactate). Les spectres de RMN $^{13}C$ des extraits cellulaires ont montré que l'incorporation de $^{13}C$ dans le glutamate était bien plus élevée lorsque le substrat enrichi était le lactate. Les contributions relatives du glucose et du lactate au métabolisme oxydatif neuronal ont pu être modélisées et étaient respectivement de 21 % et 79 % (pour des concentrations de 5,5 mM de glucose et de lactate). Ces résultats ont montré pour la première fois que lorsque les neurones sont en présence à la fois de glucose et de lactate (situation identique *in vivo*), ils utilisent de préférence le lactate comme principal substrat oxydatif.

Toujours en 2003, Smith et ses collaborateurs ont examiné l'effet du lactate sur l'absorption globale du glucose cérébral chez des sujets humains par TEP en utilisant le $^{18}$fluoro-2désoxyglucose (FDG), un analogue du glucose non métabolisable comme traceur. Huit hommes en bonne santé, âgés de 40 à 54 ans, ont subi un scan FDG-PET de 60 minutes à deux reprises, dans un ordre aléatoire. Pour l'étude « contrôle », du bicarbonate de sodium a été administré à la place du lactate de sodium afin de reproduire le changement de pH dans le sang produit par le lactate de sodium. Ensuite, pour chaque sujet, du lactate de sodium a été perfusé à une vitesse de 50 $\mu mol.kg^{-1}.min^{-1}$ pendant 20 minutes puis réduit à 30 $\mu mol.kg^{-1}.min^{-1}$ pour le reste de l'étude. Les taux de glucose plasmatique n'étaient pas différents entre les deux groupes (5,3 ± 0,23 et 5,3 ± 0,24 mM, $p = 0,55$). Par contre, le lactate plasmatique était significativement plus élevé dans le groupe recevant la perfusion de lactate. Dans ce même groupe, la consommation de glucose par le cerveau était diminuée. Les auteurs concluent que, *in vivo* chez l'homme, le lactate circulant est utilisé comme substrat énergétique par le cerveau en condition euglycémique, puisque l'utilisation de glucose est réduite. Ces résultats seront

confirmés plus tard par les travaux de Boumezbeur [22] et Gallagher [23]. Cette utilisation de lactate plasmatique par le cerveau est même augmentée lors de l'activité physique prolongée [24].

En 2004, afin de valider l'identité du type cellulaire qui métabolise préférentiellement le glucose, l'équipe de Felipe Barros a quantifié la vitesse de capture d'analogues de glucose fluorescents dans des co-cultures neurones/astrocytes d'hippocampe, en utilisant un test en temps réel basé sur la microscopie à épifluorescence confocale [25]. Lorsque du glutamate est ajouté dans le milieu de culture, la vitesse de transport du glucose dans l'astrocyte est accélérée d'un facteur 12, alors qu'elle est fortement inhibée dans le neurone. Ces résultats suggèrent qu'en présence du neurotransmetteur glutamatergique, et donc lors de l'activation synaptique, le transport du glucose est modulé de façon à ce qu'il entre préférentiellement dans les astrocytes.

Si Cholet et Voutsinos-Porche [19, 26] ont pu montrer que la mise sous silence des transporteurs au glutamate astrocytaires supprimait la réponse de capture du glucose lors de l'activation cérébrale, ce n'est que très récemment que l'expérience miroir a pu être réalisée. En 2017, Zimmer et ses collaborateurs ont cette fois utilisé la TEP, et non pas l'autoradiographie, et ont suivi le signal du [$^{18}$F]-FDG dans un modèle où l'activité du transporteur au glutamate astrocytaire était stimulée. Pour ce faire, ils ont injecté du ceftriaxone, un antibiotique pour lequel ils ont pu montrer qu'il activait le transporteur GLT-1. Ils ont pu mettre en évidence une augmentation de la capture du traceur analogue du glucose, uniquement par l'action du ceftriaxone, dans certaines zones cérébrales, zones qui se sont avérées être identiques à celles où le transporteur GLT-1 était le plus fortement exprimé [27].

## 4. Arguments en défaveur de l'ANLS

Nous insisterons sur le fait que malgré l'accumulation de résultats expérimentaux allant dans le sens de l'ANLS, l'identité du producteur de lactate tout comme l'existence de cette navette ***in vivo*** n'a pas encore été démontrée et reste controversée. Selon l'hypothèse de l'ANLS, le glucose est absorbé par les astrocytes et converti en lactate, transféré aux neurones où il est ensuite oxydé. Les arguments forts avancés pour s'opposer à cette vue sont essentiellement d'ordre théorique : **1-** la présence de transporteurs au glucose sur les neurones : on retrouve le transporteur GLUT3 sur les neurones alors que l'isoforme GLUT1, dont le Km est plus élevé, est exprimé par les astrocytes et sur les vaisseaux sanguins [28]. Pourquoi les neurones auraient-ils besoin d'un transporteur de glucose spécifique, dont les paramètres cinétiques sont plus favorables pour l'entrée de glucose si le lactate est un substrat essentiel pour lui ? **2-** le sens de circulation d'un métabolite n'est pas régi par les constantes cinétiques des transporteurs ou enzymes mais par leurs concentrations et gradients entre les différents compartiments, et par conséquent les différentes isoformes de MCT et de LDH ne conditionnent pas le sens de circulation du lactate [29].

Deux expériences ont été menées très récemment avec, cette fois, des résultats expérimentaux qui sont en défaveur de l'ANLS. La première, réalisée par Diaz-Garcia et ses collaborateurs [30], a montré que lors de l'activation cérébrale, une augmentation de la glycolyse était mise en évidence dans les neurones (étude menée sur des tranches hippocampiques et *in vivo*). Dans une seconde étude, Lundgaard et ses collaborateurs [31] ont montré, en utilisant l'imagerie à deux photons et un analogue du 2-désoxyglucose (IR2DG800) visualisé dans le proche infrarouge (2DG-IR), que le glucose entrait préférentiellement dans les neurones lors de l'activité neuronale chez des souris éveillées. Cependant, l'analogue du glucose utilisé dans cette étude a été injecté directement dans les ventricules, contournant ainsi la voie physiologique et la barrière hémato-encéphalique (les pieds astrocytaires recouvrent 99,8 % des vaisseaux sanguins [32]). De plus, la masse molaire de l'analogue au glucose utilisé dans cette étude, le IR2DG800, est de 1300 Da, c'est-à-dire supérieure à celle de la cytochalasine B (masse moléculaire 480 Da) qui bloque les GLUTs. Un travail précédent avait d'ailleurs montré que l'IR2DG800 pénétrait probablement les cellules par endocytose [33]. Lundgaard et ses collaborateurs ont aussi montré dans la même étude que l'ARNm de l'hexokinase était présent en quantité plus importante dans les neurones que dans les astrocytes. Rappelons cependant que l'hexokinase, première étape de la glycolyse, est également la première étape de la voie des pentoses phosphates, une voie métabolique très importante pour le neurone puisqu'elle vise à la production de glutathion, un métabolite qui lutte contre les espèces réactives oxygénées (ROS), délétères pour les neurones.

**À ce jour, la source de production du lactate et l'existence de cette navette *in vivo* restent controversées (voir le dernier cross-talk [34, 35]). L'objectif de cette thèse est de développer la spectroscopie *in vivo* en condition d'activation cérébrale afin de suivre les modifications métaboliques liées à cette activation, et plus particulièrement suivre les niveaux de lactate. L'activation cérébrale sera validée par IRMf afin de montrer que la navette lactate existe *in vivo*, les résultats seront comparés entre ceux obtenus sur des rats contrôles et des rats modifiés génétiquement pour un élément clé de l'ANLS, les MCTs.**

# 5. Intérêt de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

## 5.1. Concepts de base de la RMN

### 5.1.1. Effet Zeeman

En RMN, un noyau est observable si son spin nucléaire est non nul. Le spin d'une particule est son moment angulaire intrinsèque. C'est une propriété quantique qui ne peut prendre que des valeurs entières ou demi-entières. Le noyau de l'atome d'hydrogène ($^{1}$H) est constitué d'un seul proton. Son spin est égal à ½. Pour le carbone 13 ($^{13}$C), le nombre quantique de spin est de ½ aussi.

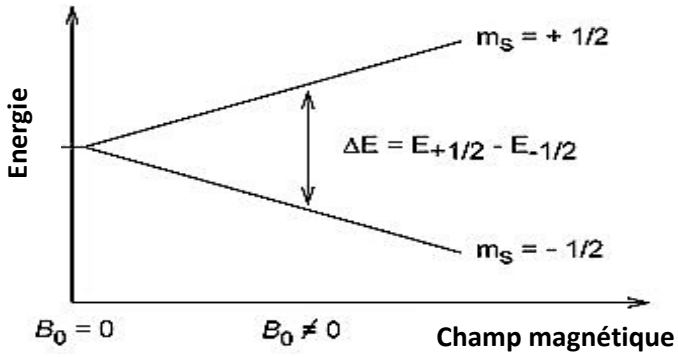



***Figure 3 : L'écart énergétique (ΔE) entre spins « Up » et « Down » s'accroit avec l'intensité du champ magnétique statique B0.***

Si l'on place un $^{1}$H dans un champ magnétique intense $\overrightarrow{B_0}$, son moment magnétique $\mu_z$ peut occuper deux états quantiques distincts « Up » ($\mu_z$ =+1/2) ou « Down » ($\mu_z$ =-1/2) correspondant à deux niveaux d'énergie (***Figure 3***). Cette différence d'énergie $\Delta E$ est égale à $\gamma\hbar B_0$ avec ħ, la constante de Planck réduite et le rapport gyromagnétique $\gamma$, une constante liée au noyau est qui est de $26{,}752\ 10^{7}\ \mathrm{rad}\,.\,s^{-1}.T^{-1}$ pour l'hydrogène. Pour le $^{13}$C, ce rapport gyromagnétique est seulement 1/4 de celui du proton. Si l'on ajoute son faible pourcentage d'abondance naturelle, sa sensibilité relative à celle du proton est donc de 4 ordres de grandeur plus faible. Par ailleurs, les spins « précessent » autour de $\overrightarrow{B_0}$ à une vitesse angulaire $\omega_0 = \gamma.B_0$. Le phénomène de résonance magnétique nucléaire consiste à exciter le spin avec une onde électromagnétique à la fréquence de Larmor $\nu_0 = \omega_0/2\pi$ permettant la transition d'un spin de l'état « Down » à « Up ».

### 5.1.2. Polarisation et distribution de Boltzmann

Considérons une population de spin ½ dans un champ magnétique intense $\overrightarrow{B_0}$, l'application de la statistique de Boltzmann à l'équilibre thermodynamique est la suivante :

$$\frac{N_-}{N_+} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}}$$

avec $N_-$, le nombre de spin « Down », $N_+$ le nombre de spin « Up », $k$ la constante de Boltzmann et T la température (en Kelvin). On sait que :

$$\Delta E = \hbar.\gamma.B_0 \quad \text{d'où} \quad \frac{N_-}{N_+} = e^{\frac{-\hbar.\gamma.B_0}{kT}}.$$

À température ambiante (soit 300 K), $\Delta E$ est très inférieure à l'énergie thermique $kT$, d'où :

$$\frac{N_-}{N_+} \approx 1 + \frac{\hbar.\gamma.B_0}{kT}.$$

En conséquence, la polarisation des spins (i.e. le surplus de spins dans l'état de plus haute énergie) est proportionnelle au champ magnétique. Plus $B_0$ est intense, plus grande est l'aimantation résultante (somme des moments magnétiques $\mu_Z$). Toutefois, cette polarisation reste faible de l'ordre de $10^{-5}$ à $10^{-6}$.

### 5.1.3. L'expérience RMN

Afin de détecter l'aimantation macroscopique $\vec{M}$, il faut perturber le système de spins, ce qui peut être réalisé par l'application d'un champ radiofréquence $B_1$ perpendiculaire à $B_0$ à la fréquence de Larmor (***Figure 4***). D'après le formalisme semi-classique de la RMN, l'équation d'évolution de l'aimantation $\vec{M}$ (Equation de Bloch) s'écrit :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma.\vec{M} \wedge \vec{B}$$

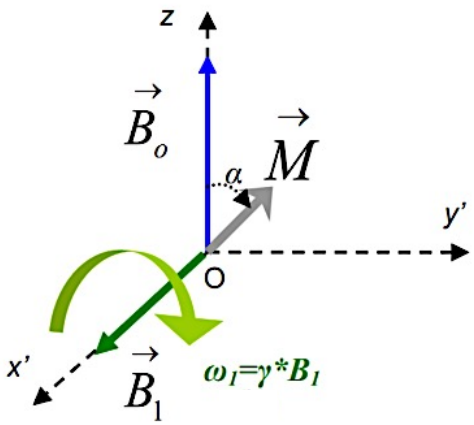



***Figure 4: Bascule de l'aimantation M autour du champ radiofréquence $B_1$ d'un angle α.***

où $\vec{B} = \vec{B_1} + \vec{B_0}$ est le champ magnétique total appliqué au système dans le référentiel tournant à la vitesse angulaire de Larmor. Ainsi l'excitation radiofréquence $B_1$ va basculer l'aimantation $\vec{M}$ autour de son axe d'un angle $\alpha = \gamma.B_1.\tau$ (avec $\tau$ le temps d'application de l'onde radiofréquence). En conséquence, la précession de la composante transversale de l'aimantation $M_T(t)$ pourra être mesurée par une antenne radiofréquence positionnée à proximité de l'échantillon. La force électromotrice induite dans l'antenne correspond au signal RMN $S(t)$ (après pré-amplification et conversion analogique-numérique) et est appelé Free Induction Decay (FID).

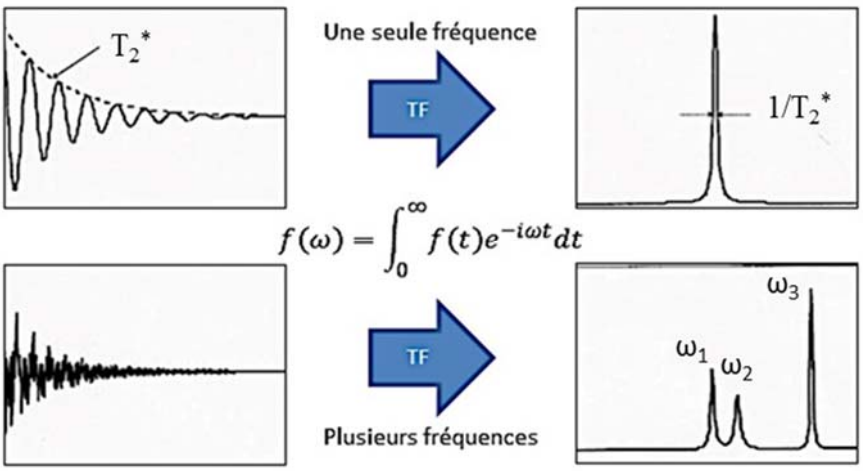



***Figure 5 : FID et spectres d'un système de spins mono- ou poly-chromate.***

L'application d'une transformée de Fourier au signal RMN $S(t)$ permet de visualiser un spectre RMN $\widehat{S(\nu)}$ des fréquences de Larmor expérimentées par les spins dans l'échantillon. Elle transforme donc un signal en fonction du temps (FID) en un signal en fonction des fréquences (pic sur le spectre) (***Figure 5***). Les aires des différents pics sont proportionnelles aux

concentrations des spins précessant à une fréquence donnée, et donc au métabolite générant ce signal.

### 5.1.4. Déplacement chimique

Le déplacement chimique est ce qui permet pour un noyau identique de différencier les métabolites et la position de ce noyau dans le métabolite. En effet, si on prend l'exemple du $^1$H, il ne va pas résonner à une seule fréquence, mais pour chaque proton à une position donnée portée par une molécule sa fréquence de résonance va légèrement varier. Dans une expérience de RMN, chaque proton à une position donnée portée par une molécule va donc avoir une FID différente, et après transformée de Fourrier, un pic à une fréquence différente: cela s'appelle le déplacement chimique, qui permet d'obtenir un spectre avec de multiples pics, chaque pic correspondant à une position sur une molécule particulière. Le déplacement chimique correspond au décalage de la fréquence de Larmor pour un spin en fonction de son environnement chimique, qui constitue un nuage électronique et donc un blindage électronique qui atténue localement le champ magnétique perçu par le noyau (***Figure 6***). Chaque $^1$H va donc "percevoir" non pas le champs magnétique $B_0$ mais un champ qui sera très légèrement modifié en fonction de son environnement chimique (qui est différent pour chaque $^1$H selon la molécule et sa position dans la molécule). La fréquence de résonance $\nu$ est alors :

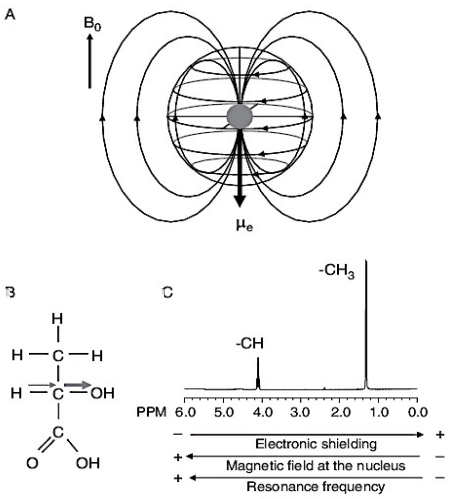



***Figure 6 : Le déplacement chimique trouve son origine dans l'écrantage du champ statique par le nuage électronique. Exemple : molécule de lactate.***

$$\nu = \gamma.\frac{B}{2\pi} = \gamma.\frac{(B_0 - \sigma)}{2\pi}$$

avec $\sigma$ l'effet d'écrantage des électrons. Par définition, le déplacement chimique δ est : $\delta = (\nu - \nu_{ref})/\nu_{ref}$ et est exprimé en parties par millions (ppm), $\nu_{ref}$ étant la fréquence de résonance d'un composé de référence (exemple : le tetra-methyl-silane). Le déplacement chimique δ est indépendant du champ magnétique $B_0$. En conséquence, il est possible de détecter et d'identifier un composé par l'analyse de son spectre RMN. L'augmentation du champ $B_0$ va par contre permettre d'améliorer la résolution spectrale, i.e. d'accroitre en valeur absolue l'écart fréquentiel entre composés résonnant à proximité l'un de l'autre (meilleur séparation des pics).

## 5.2. Spectroscopie RMN du proton *in vivo*

La spectroscopie RMN (SRM) *in vivo* est une branche de la RMN focalisée sur l'étude non invasive de la biochimie et en particulier du métabolisme des tissus et organes vivants. Comme en IRM, on s'intéresse le plus souvent aux noyaux d'hydrogène qui se trouvent en quantité importante dans les tissus vivants. Par contre, la SRM ne s'intéresse pas aux $^1$H de l'eau (~80 mol.L$^{-1}$) mais aux $^1$H des dizaines de biomolécules mobiles en concentrations milli-molaires

(de 0,1 à 10 mmol.$L^{-1}$) présentes dans les tissus. Dans le cerveau, ces métabolites d'intérêt exhibent des résonances dans une plage spectrale de 10 ppm. L'analyse des spectres RMN permet de détecter et quantifier ces métabolites et de suivre leurs variations ou de comparer leurs concentrations. Cependant, l'information doit être extraite de manière fiable, c'est pour cela qu'il est important de limiter les artefacts, d'obtenir une résolution spectrale élevée, une sensibilité optimale et d'enregistrer les signaux provenant d'un emplacement spatial très bien défini. L'acquisition de spectres de RMN du proton de haute qualité dépend donc de la localisation spatiale bien définie, de l'homogénéité du champ magnétique optimisée et d'une suppression efficace du signal de l'eau.

### 5.2.1. Localisation du signal RMN *in vivo*

Afin d'obtenir la concentration de plusieurs métabolites dans un volume d'une coupe d'intérêt, nous avons utilisé la principale approche de localisation spatiale du signal en SRM qui est l'acquisition monovoxel (ou single voxel spectroscopy – SVS). Comme en imagerie conventionnelle, des gradients d'encodage sont nécessaires, en particulier des gradients d'encodage de phase pour chaque dimension spatiale. Cette technique repose sur le principe qu'une impulsion radio fréquence (RF) sélective en fréquence et est exécutée en présence d'un gradient de champ magnétique qui sélectionne une tranche sélective dans l'espace. Lorsque trois impulsions RF consécutives sont appliquées le long de trois gradients de champ magnétique orthogonaux, l'intersection entre les trois plans définit un seul pavé droit ou parallélépipède appelé voxel (***Figure 7A***). La taille et l'emplacement du volume sont facilement réglables en modifiant respectivement la force du gradient de champ magnétique et le décalage RF. Il existe différents types de séquences SVS et cela dépend essentiellement du type d'impulsion RF pour la sélection des tranches.

- Pour la séquence STEAM (stimulated echo acquisition mode) [36] (***Figure 7B***), trois impulsions sont utilisées pour la définition du volume. Les avantages de cette séquence sont qu'elle peut conserver un temps d'écho très court, qu'elle ne présente qu'un faible dépôt d'énergie RF et stocke temporairement la magnétisation sur l'axe z pendant la période entre la deuxième et la troisième impulsion de 90°. L'inconvénient principal de cette séquence est sa réduction de signal inhérente de 50 %.

- Pour la séquence PRESS (point resolved spectroscopy) [37] (***Figure 7C***), on obtient une définition de volume par une impulsion RF de 90° et deux de 180°. Bien que le temps d'écho minimum soit nécessairement plus long, la séquence conserve l'intensité du signal. La nature de l'écho n'est pas la même que pour la séquence STEAM, celui-ci est formé des suites d'une magnétisation complète tandis que pour la séquence STEAM seulement une partie de signal créé l'écho stimulé d'où l'application d'un gradient pendant le temps de mélange.

La séquence PRESS a un meilleur rapport signal sur bruit que la séquence STEAM et permet de réduire la dimension du voxel, ou région d'intérêt (ROI) en gardant la même qualité de signal. Cependant, la séquence STEAM permet d'observer des métabolites avec de très courts $T_2$. Généralement, à ces séquences s'ajoutent des bandes de saturation (ou Outer Volume Saturation – OVS). L'application d'OVS permet d'éliminer les lipides extra-crâniens qui compliquent l'analyse des spectres intracérébraux notamment autour de la gamme fréquentielle 0,5-2,0 ppm. Ce module d'OVS est composé d'impulsions spatialement sélectives suivies de gradient de déphasage pour détruire/saturer l'aimantation dans la bande. La réduction de la zone spatiale étudiée permet techniquement de se focaliser sur un champ magnétique très homogène dans une petite zone, réduire la résonance lipidique extra-crânienne tout en optimisant la résolution spectrale. Cependant, en utilisant la séquence LASER (localization by adiabatic selective refocusing), celle-ci n'a pas besoin d'être accompagnée d'OVS pour améliorer son efficacité (***Figure 7D***). Cette séquence est celle que nous utiliserons in vivo pour l'acquisition de l'intégralité de nos FID [38]. Après une impulsion d'excitation adiabatique non sélective de 90°, la localisation 3D est réalisée par trois paires d'impulsions adiabatiques à 180°. La séquence LASER est complètement adiabatique, ce qui signifie que l'angle de nutation des impulsions RF est indépendant de l'amplitude du champ magnétique $B_1$. Cela garantit que pour une bobine RF donnée, une sensibilité optimale est obtenue même en présence de l'inhomogénéité du champ magnétique $B_1$. De plus, comme les impulsions adiabatiques de 180° ont typiquement une bande passante très large et bien définie, la définition du volume est excellente avec un déplacement minimal du déplacement chimique. Cela est un critère majeur que nous nous devons de mettre en avant concernant notre étude. Le principal inconvénient de la séquence LASER est que le besoin de sept impulsions RF entraîne une augmentation de la déposition de puissance RF. De plus, le temps d'écho minimal est souvent beaucoup plus long que pour les séquences STEAM ou PRESS. Concernant l'optimisation des paramètres de la séquence préalablement implémentée, nous verrons cela dans le chapitre suivant.

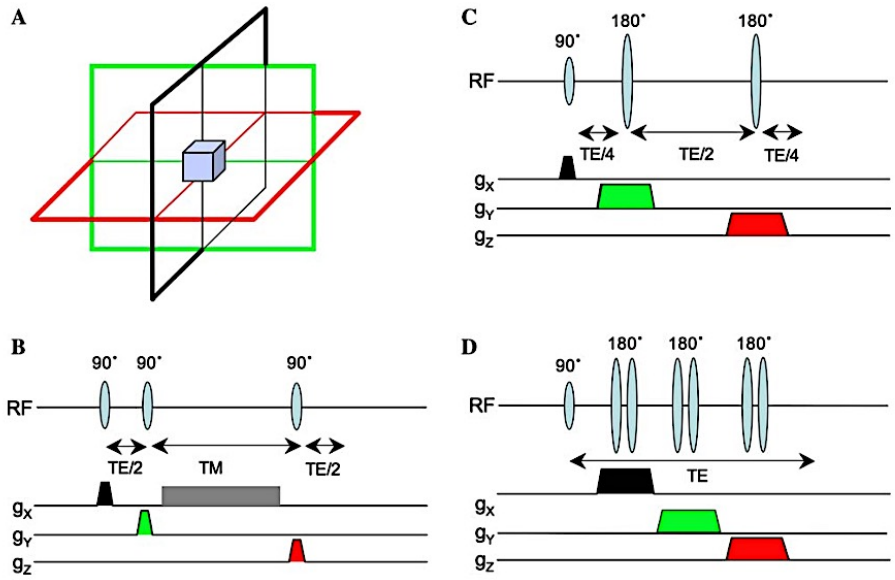



***Figure 7 : Chronogrammes des différentes techniques de sélection du voxel (Figure extraite de l'article de Zhu et al. [39]).***

### 5.2.2. Principaux métabolites d'intérêt

N-acétyl-aspartate (NAA) et N-acétyl-aspartyl-glutamate (NAAG) : 2,01 ppm

Le NAA est un métabolite concentré dans les neurones et les oligodendrocytes. Il possède des fonctions diverses notamment comme osmolyte et précurseur pour la synthèse de NAAG ou comme tampon énergétique. Il est souvent le pic le plus intense dans les profils neurochimiques et est considéré comme un marqueur d'intégrité neuronale. Sa baisse a été observée dans de très nombreuses et diverses conditions pathologiques (accident vasculaire cérébral (AVC), maladie d'Alzheimer, gliomes, etc..). A 7 Teslas, il est chose aisée de distinguer le NAA du NAAG beaucoup moins concentré.

Créatine (Cr) et phospho-créatine (PCr) : 3,03 ppm

La PCr sert de tampon énergétique dans les cellules permettant la conversion rapide de l'ADP en ATP à travers l'activité de la créatine kinase. En spectroscopie $^{1}H$, les formes phosphorylées (PCr) et déphosphorylées (Cr) sont le plus souvent indistinguables (tCr) sauf à ultra-haut champ magnétique.

Composés choline (tCho) : 3,22 ppm

Le groupement choline ($N(CH_3)_3$) se retrouve notamment dans les métabolites phospho-choline (PCh) et glycéro-phospho-choline (GPC). Ces métabolites sont impliqués dans les processus de synthèse des phospholipides membranaires et sont également libérés à l'occasion d'une déstabilisation de la membrane cellulaire. Par conséquence, tCho est un excellent marqueur du métabolisme membranaire dans des cas de prolifération cellulaire (ex : gliome), de neuroinflammation/démyélinisation, voire de mort cellulaire aigüe (AVC).

Glutamate (Glu) et glutamine (Gln) : 2,35 ppm et 2,45 ppm

Le Glu est le neurotransmetteur excitateur principal du système nerveux central. Après relargage par les neurones glutamatergiques présynaptiques au niveau des synapses, il est recyclé par les cellules gliales (astrocytes) où il est converti en Gln. La Gln sera libérée à son tour pour être captée par les neurones qui la convertiront en Glu afin de reconstituer leur stock de neurotransmetteur. Logiquement, le Glu est principalement concentré dans les cellules neuronales alors que la Gln est principalement dans les cellules gliales (la glutamine synthétase, qui permet la synthèse de glutamine à partir du glutamate est d'ailleurs une enzyme exclusivement astrocytaire [40]). À 7 Teslas, il est possible de distinguer les protons portés par les carbones 4 de Glu et Gln en particulier avec une homogénéité du champ $B_0$ relativement bonne.

Myo-inositol (Ins) et scyllo-inositol (Scyllo) : 3,56 ppm et 3,35 ppm

L'inositol est un sucre cyclique dont l'isoforme majoritaire est l'Ins tandis que son isoforme symétrique est le scyllo-inositol, minoritaire. Il joue un rôle d'osmolyte mais aussi de précurseur de composés comme l'inositol triphosphate ($IP_3$) impliqué dans de nombreuses voies de régulation cellulaire. Il est principalement concentré dans les cellules gliales et est considéré comme un marqueur de la densité/activité gliale.

Lactate : méthyl à 1,32 ppm et $^{1}H$ porté par carbone 2 à 4,10 ppm (quadruplet)
Le lactate est un substrat énergétique, produit de l'oxydation partielle du glucose (glycolyse). En situation normale (aérobie), sa concentration est faible dans le cerveau (de l'ordre du $mmol.L^{-1}$). En cas d'anaérobie, l'oxydation totale du glucose est limitée par le manque d'oxygène et une accumulation de lactate est observée. C'est notamment le cas dans les tumeurs en raison de leur suractivité métabolique combinée à leur hypo-perfusion chronique. Mais c'est aussi le cas des cellules en souffrance métabolique aigüe, le plus souvent avant leur mort par apoptose ou nécrose. Il est considéré par les radiologues comme un marqueur de mauvais pronostique dans de nombreuses pathologies.

### 5.2.3. Outils de décomposition spectrale

LCModel [41, 42] et AMARES/MRUI [43-45] sont les outils les plus couramment utilisés pour l'analyse de spectres à temps d'écho courts. Comme l'illustre le spectre $^{1}H$ montré ***Figure 8***, la décomposition spectrale est un problème complexe généralement considéré dans le domaine temporel (avec AMARES/MRUI) ou dans le domaine spectral (avec LCModel) comme un problème inverse linéaire mal posé.

En raison de sa plus grande robustesse et précision par rapport à AMARES notamment pour le calcul de ratio de concentrations par rapport au signal de Créatine dans des conditions dégradées de signal et d'homogénéité du champ $B_0$ [46], LCModel a été choisi pour l'analyse de nos données de spectroscopie RMN *in vivo* du proton.

LCModel signifie "Linear Combination of Model spectra". Ce logiciel est commercialisé par le Dr. S.W. Provencher. LCModel utilise un groupe de programme FORTRAN permettant la résolution parcimonieuse de problèmes inverses linéaires bruités [47]. LCModel incorpore des contraintes/connaissances à priori dans la définition de son paramètre de régularisation afin de trouver une solution optimale plus précise et robuste. Par ailleurs, l'erreur de quantification est estimée sous la forme d'une borne de Cramer-Rao (CRLB) à partir de la matrice de covariance de la solution contrainte régularisée. En pratique, LCModel utilise une base de spectres-modèles (simulés ou expérimentaux) correspondant à l'ensemble des spectres des métabolites détectables *in vivo* (moins d'une vingtaine à 3 Tesla) à laquelle s'ajoutent un spectre des macromolécules, des connaissances à priori et autres contraintes physiques (largeur à mi-hauteur caractéristique pour le filtrage gaussien/lorentzien, relations de phase, moyennes et déviations standards des ratios entre métabolites, etc…).

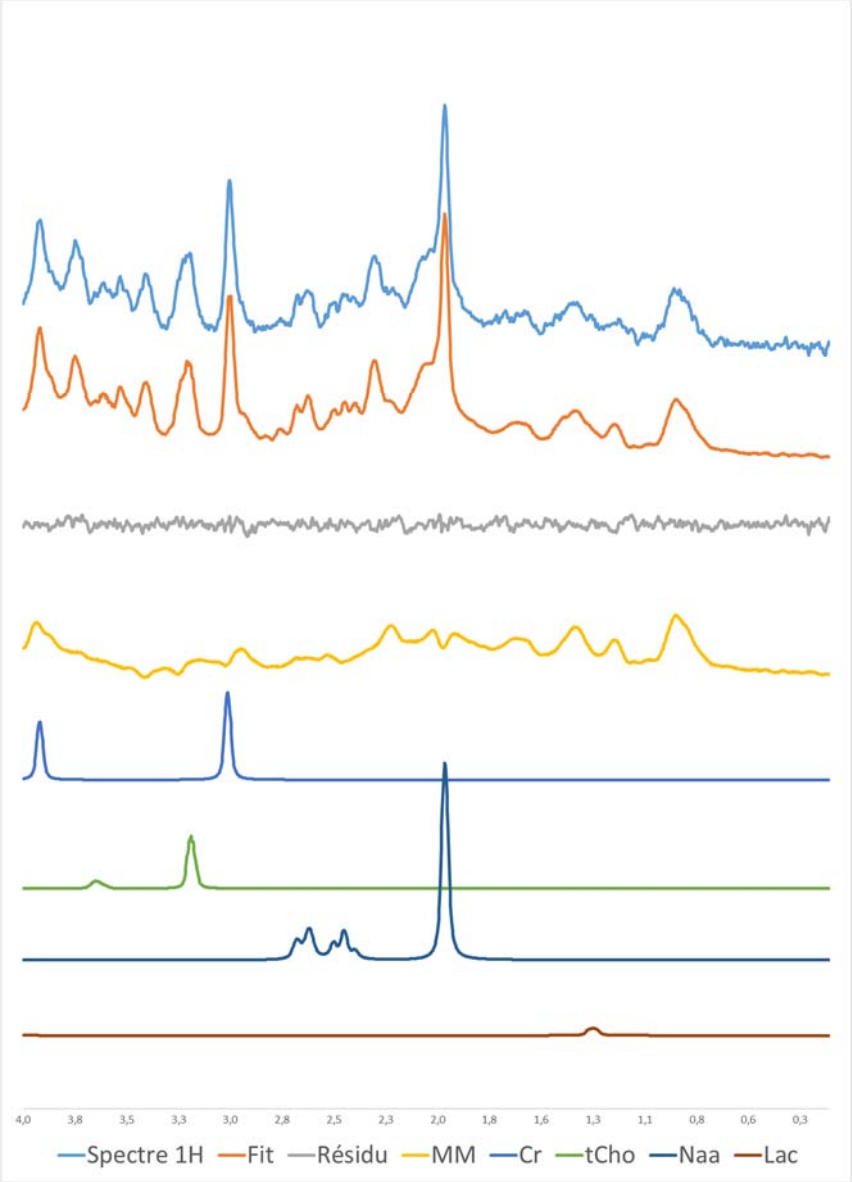



***Figure 8 : Décomposition spectrale typique d'un profil métabolique avec LCModel. On peut voir le spectre (en bleu), son ajustement (en orange), le signal résiduel, le spectre des lipides et macromolécules ainsi que les spectres des métabolites principaux.***

### 5.2.4. Homogénéité du champ magnétique

Le « shimming » est le nom donné à la méthode d'optimisation de l'homogénéité du champ magnétique, cette étape est d'une importance cruciale en RMN. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la fréquence de Larmor $\omega_0$ à laquelle le spin précesse est directement proportionnelle au champ magnétique local $B_0$. Lorsque le champ magnétique est spatialement homogène, la fréquence de Larmor est la même pour toutes les positions. Puisque le signal localisé correspond à la somme des signaux provenant du volume localisé en 3D, le signal total est donc également traité à la fréquence de Larmor. Dans le cas où le champ magnétique est spatialement inhomogène, les spins situés à des emplacements spatiaux différents ont des fréquences de Larmor différentes. En conséquence, les spins situés à des

emplacements différents acquièrent une quantité de phase différente après l'excitation, ce qui conduit à une annulation de phase sur un volume macroscopique. L'annulation de phase conduit à une constante de temps de relaxation apparente $T_2$ plus courte et donc à des lignes de résonance plus larges et à une perte de résolution spectrale.

L'un des moyens les plus simples d'améliorer l'homogénéité du champ magnétique consiste à réduire le volume dans lequel le signal est observé. Sinon, le « shimming » actif qui est basé sur des fonctions harmoniques sphériques [48] est la méthode standard pour améliorer l'homogénéité du champ magnétique. Chaque système de résonance magnétique est équipé d'un certain nombre de bobines de compensation qui produisent des champs magnétiques variant dans l'espace correspondant à l'une des fonctions harmoniques. Le but principal du « shimming » actif consiste à trouver une combinaison de champs harmoniques sphériques qui annule au mieux l'inhomogénéité du champ magnétique dans l'échantillon. Une méthode quantitative et automatisée de cartographie du champ magnétique par IRM a été utilisée afin d'améliorer l'homogénéité du champ magnétique.

#### 5.2.5. Suppression du signal de l'eau

Une fois les exigences d'une localisation spatiale et une homogénéité du champ magnétique respectées, la suppression du signal de l'eau est une étape à tout aussi bien optimiser. Comme la résonance de l'eau est généralement supérieure de plusieurs ordres de grandeur aux résonances des métabolites, sa présence entraîne des distorsions de la ligne de base et des signaux des métabolites. En conséquence, pour la plupart des applications de SRM du $^{1}H$, le signal de l'eau doit être supprimé, sans perturber les résonances des métabolites. La suppression d'une résonance particulière dans un spectre de RMN nécessite une différence de propriété entre la molécule d'intérêt et le composé interférant. La méthode de suppression de l'eau VAPOR a été utilisée. VAPOR se compose d'une série d'impulsions d'excitation sélective en fréquence pour l'eau suivie d'un gradient de champ magnétique. L'eau est ainsi excitée dans le plan transversal, où elle sera détruite (déphasée) par le gradient de champ magnétique, tandis que les résonances des métabolites résident le long de l'axe longitudinal. Ceci permet d'obtenir une suppression efficace du signal de l'eau même dans le cas de volume d'intérêt de grande taille.

### 5.3. Spectroscopie RMN du $^{13}C$ *ex vivo*

Seul l'isotope $^{13}C$ du carbone de spin 1/2, dont l'abondance naturelle n'est que de 1,1 %, est détectable par RMN, alors que le principal isotope du carbone, le $^{12}C$ a un spin nul : il est donc non visible en RMN. Sans perfusion de substrats marqués au $^{13}C$, de très faibles signaux d'abondance naturelle provenant des métabolites cérébraux les plus concentrés seraient enregistrés. La perfusion de substrats enrichis en $^{13}C$ avec des enrichissements isotopiques élevés améliore non seulement le rapport signal sur bruit, mais permet également une mesure dynamique de l'incorporation de $^{13}C$ dans des métabolites situés en aval, fournissant ainsi des informations métaboliques uniques.

La spectroscopie RMN $^{13}C$ *in vivo* combinée à la perfusion de glucose enrichis en $^{13}C$ permet une étude non invasive du métabolisme cérébral chez l'animal. L'évolution temporelle de l'incorporation du marqueur $^{13}C$ du glucose dans les métabolites cérébraux peut être analysée afin de quantifier les flux métaboliques de voies métaboliques spécifiques telles que les cycles de Krebs au niveau des neurones et des cellules gliales, la pyruvate carboxylase ou le cycle glutamate-glutamine. Peu de groupes font de la RMN *in vivo* du $^{13}C$ qui reste à l'heure actuelle un challenge [49-52].

Nous avons choisi de faire de la SRM du $^{1}H$ *in vivo* et de la SRM du $^{13}C$ *ex vivo*, après perfusion de [1-$^{13}C$]glucose. La méthode de perfusion (qui suit une exponentielle décroissante) a été conçue afin d'augmenter rapidement et de maintenir une glycémie et un enrichissement isotopique du [1-$^{13}C$]glucose élevés. Ce changement important et rapide de l'enrichissement isotopique plasmatique du substrat entraîne de grands changements dynamiques des enrichissements isotopiques des métabolites mesurés par SRM $^{13}C$ (tels que le glutamate ou la glutamine). La SRM $^{13}C$ a été acquise sur des extractions perchloriques de biopsies cérébrales après 1 h de perfusion, c'est-à-dire à l'état stationnaire isotopique.

# Chapitre 2. Matériels et méthodes

## 1. Modèle d'activation

Il existe de nombreuses méthodes de stimulation neuronale utilisées expérimentalement chez l'animal. Certaines sont peu ou non-invasives telles que la stimulation visuelle ou des vibrisses, d'autres sont plus délétères (électrodes permettant une stimulation électrique de la patte, stimulation chimique, optogénétique). La stimulation des vibrisses a été choisie pour sa simplicité de mise en œuvre, sa compatibilité avec l'IRM [53] ainsi que pour son caractère non délétère pour l'animal. L'activité cérébrale a donc été étudiée dans le cortex somatosensoriel primaire, au niveau de la zone dite des « tonneaux » ou S1BF (somatosensory barrel field 1) (***Figure 9a et b***). On retrouve dans cette zone les neurones qui seront activés lors de la stimulation des vibrisses, avec une organisation très particulière, bien définie car depuis longtemps étudiée : chaque vibrisse est associée à un tonneau du S1BF de l'hémisphère controlatéral dans lequel sont organisés jusqu'à 19000 neurones chez le rat [54] (***Figure 9c***). La stimulation de l'ensemble des vibrisses droites de l'animal entraîne l'activation du S1BF gauche (***Figure 9d***).

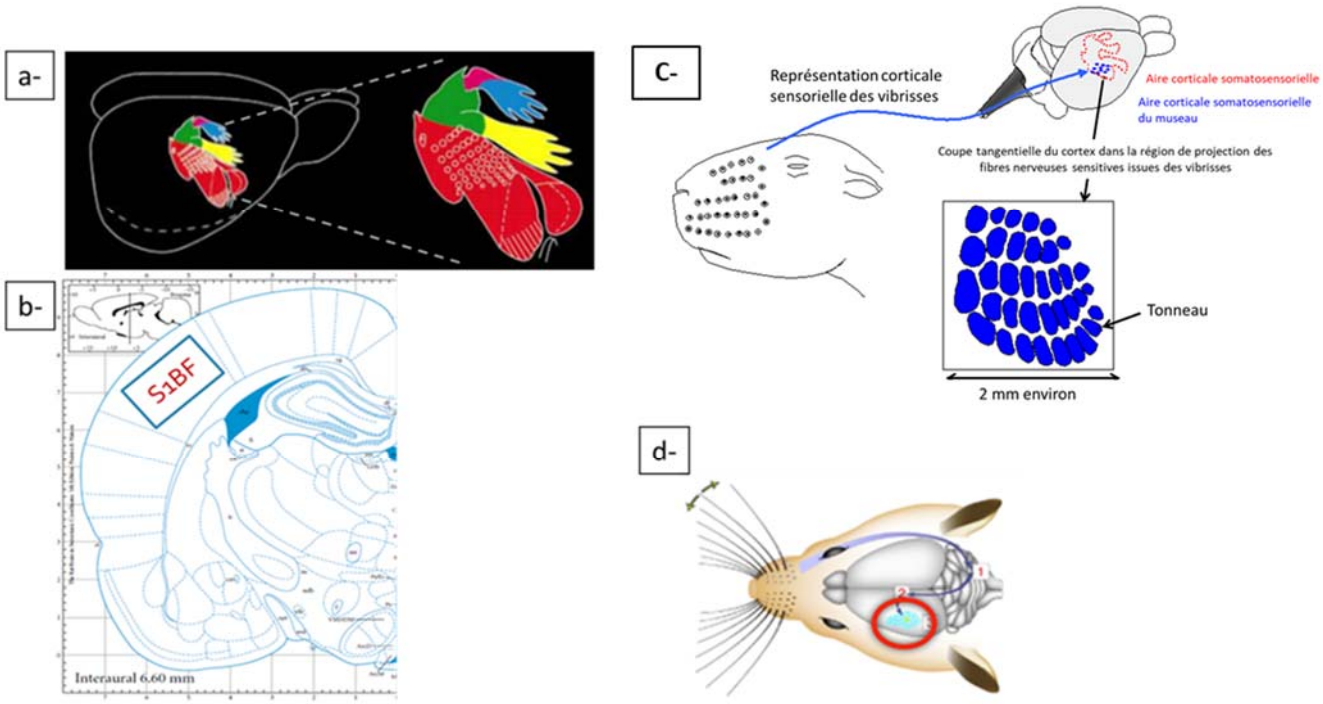



***Figure 9 : (a) Représentation somatotopique chez le rat permettant de localiser le barrel cortex (S1BF) et mettre en évidence l'importance des vibrisses pour cet animal [55], (b) Localisation stéréotaxique de la zone S1BF, (c) Schématisation de l'association entre une vibrisse et un tonneau dans la zone S1BF, [56] (d) Représentation de l'induction de la stimulation du S1BF controlatéral par la stimulation des vibrisses.***

## 2. Installation, réglages et acquisitions

Le déroulement standard d'une expérimentation est présenté ***Figure 10***.

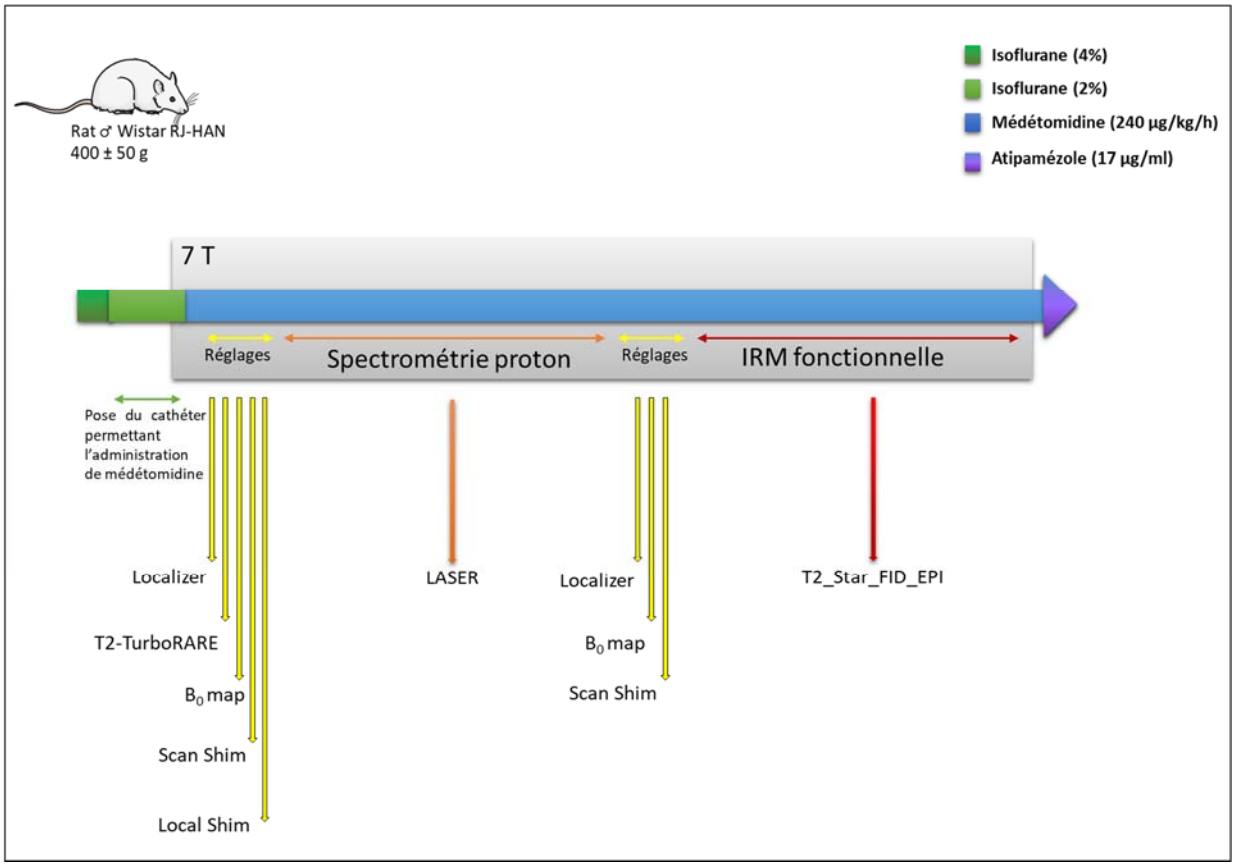



***Figure 10 : Schéma général d'une expérience in vivo.***

### 2.1. Animaux

Toutes les procédures utilisant des animaux ont été menées conformément aux directives concernant l'expérimentation animale du Conseil des Communautés Européennes du 24 novembre 1986 (86/609/CEE). Les protocoles respectent les règles éthiques du ministère de l'Agriculture et des Forêts et ont été approuvés par le comité d'éthique local (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Bordeaux, autorisation n°50112090-A). Lors des mesures IRM, un niveau adéquat d'anesthésie et une surveillance physiologique (température corporelle, fréquence respiratoire) sont indispensables. Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles Wistar RJ-HAN (Laboratoires Janvier, France) pesant 400 ± 50 g et hébergés en cycle 12 h/12 h lumière/obscurité avec nourriture et eau *ad libitum*.

## 2.2. Anesthésie

Le matériel et les réactifs suivants ont été utilisés pour l'anesthésie (***Figure 11A et B***) : un vaporisateur d'anesthésie gazeuse (modèle 100; Surgivet, Harvard Apparatus, France), une chambre d'induction (30 x 17 x 15 cm), un masque fabriqué à partir d'une seringue pour l'administration d'isoflurane lors de la pose du cathéter, des rubans adhésifs pour la contention du rat et le maintien après installation, du cathéter intraveineux (22G, 85 x 25 mm; Terumo, France), de l'isoflurane (liquide pour inhalation; Vetflurane, 1000 mg/mL, Vibrac, France), de l'héparine (Heparin choay, solution injectable, 5 000 UI / mL; Sanofi, France), du chlorhydrate de médétomidine 1 mg/mL (Domitor; Vétoquinol SA, France), de l'atipamezole (sous forme de chlorhydrate : 4,28 mg ; Antisedan Vetoquinol SA, France) pour le réveil et de la pommade pour les yeux de l'animal (Ocry Gel 10 grs, TVM). Il faut alors préparer : une seringue de 2 mL avec une solution saline physiologique et quelques gouttes d'héparine, une seringue avec une fine tubulure pour l'application d'un garrot, une seringue de 5 mL avec du chlorhydrate de médétomidine dilué dans une solution saline physiologique (240 µg/kg/h – débit de perfusion: 20 µL/min), une seringue de 0,5 mL avec une solution saline physiologique et 20 µL d'antisedan et. Tout le matériel reste sous la hotte, sauf la seringue de 5 mL avec le chlorhydrate de médétomidine qui est insérée dans le pousse-seringue près de l'aimant (Bruker 7T).

Pour réaliser nos expériences, et mesurer en particulier les quantité de lactate *in vivo*, l'utilisation d'isoflurane (anesthésique le plus courant utilisé en IRM) était à proscrire, celui-ci ayant une influence sur la concentration de lactate dans le cerveau du rat, qui peut être multiplié jusqu'à 7 sous cet anesthésique gazeux [57]. Nous avons donc opté pour l'utilisation de médétomidine, un sédatif analgésique et myorelaxant, car cette molécule n'a que très peu d'influence sur le métabolisme [58] tout en permettant d'obtenir un signal positif en IRM fonctionnelle [59]. Quelques soucis ont été rencontrés avec la médétomidine durant les premières expériences. Son effet (tout en utilisant les mêmes consignes de mode d'injection et de doses prescrites) pouvait varier d'un rat à l'autre. Un faible pourcentage de mortalité durant l'expérimentation ainsi que des gênes occasionnées (réveil, accélération légère, constante ou brutale du mouvement respiratoire) lors de l'administration en sous-cutanée ont conduit à une modification du mode d'administration. Afin de limiter les effets secondaires, la médétomidine a donc été administrée en intra-veineuse. Pour ce faire, la dose a été optimisée tout comme la méthode.

Pour l'intégralité des expériences réalisées *in vivo*, l'anesthésie a été effectuée en deux temps : dans un premier temps par inhalation d'isoflurane durant la pose du cathéter et le positionnement du rat dans l'aimant (4 % induction, maintenue à 2 % lors du passage du rat de la hotte à l'aimant) puis par une injection intraveineuse de médétomidine parallèlement à l'arrêt de l'isoflurane qui se fait progressive sur 5 min.

***Figure 11 : Étapes d'anesthésie permettant la pose du cathéter, avant le placement du rat dans l'aimant. (A) Matériel et réactifs nécessaires à l'anesthésie du rat. (B) Poste de primo-anesthésie. (C) Pose du garrot. (D) Fin de la primo-anesthésie.***

Pour l'intraveineuse, la queue a été réchauffée dans de l'eau chaude (38-42°C) et massée afin de favoriser la vasodilatation du système sanguin caudal ; l'utilisation d'un garrot a facilité la localisation de la veine caudale droite ou gauche, pour l'insertion du cathéter (***Figure 11C***). Le cathéter intraveineux périphérique, préalablement hépariné, a ensuite été inséré le plus bas possible dans la veine. Un retour veineux (une goutte de sang visible à la partie distale de l'aiguille) était observable lorsque le cathéter était correctement placé (***Figure 11D***). Les bulles d'air présentes dans le volume mort du cathéter ont été chassées à l'aide d'une seringue de 2 ml contenant une solution saline physiologique et de l'héparine. De l'ocrygel a été appliqué sur les yeux du rat afin d'éviter tout dessèchement cornéen. Avant de quitter le poste de la hotte, la solution de réveil a été préparée (atipamézole 17 µg/mL).

### 2.3. Positionnement du rat dans l'aimant

Le rat a été transporté rapidement de la paillasse, où la pose du cathéter a été effectuée, jusqu'à la pièce de l'aimant 7T. Le rat était positionné sur le ventre sur le lit de l'aimant, avec le museau dans le masque à isoflurane. Afin que les vibrisses droites puissent bouger pour notre protocole de stimulation sans rencontrer d'obstacle, le bord droit du lit a été coupé au préalable (***Figure 12A***). Un capteur de respiration positionné au niveau de l'abdomen du rat

et un système de chauffage permettaient de maintenir l'animal dans des conditions optimales d'anesthésie durant les acquisitions (***Figure 12B).*** Le système de surveillance de la respiration permettait de légers réglages au niveau du débit de médétomidine pour maintenir la respiration du rat entre 60 et 80 respirations par minute. Lorsque le rat était positionné sur le lit, la transition progressive entre les deux modes d'anesthésie, isoflurane et médétomidine était effectuée. De l'adhésif a été utilisé pour emprisonner les vibrisses du rat (***Figure 12C***). Le tuyau de sortie d'air a été positionné le long du lit de l'aimant afin que le flux d'air sortant du tube soit perpendiculaire à la surface de la voile. Une vérification du déplacement adéquat de la voile de vibrisses a été réalisée grâce à une brève activation du système d'air pulsé.

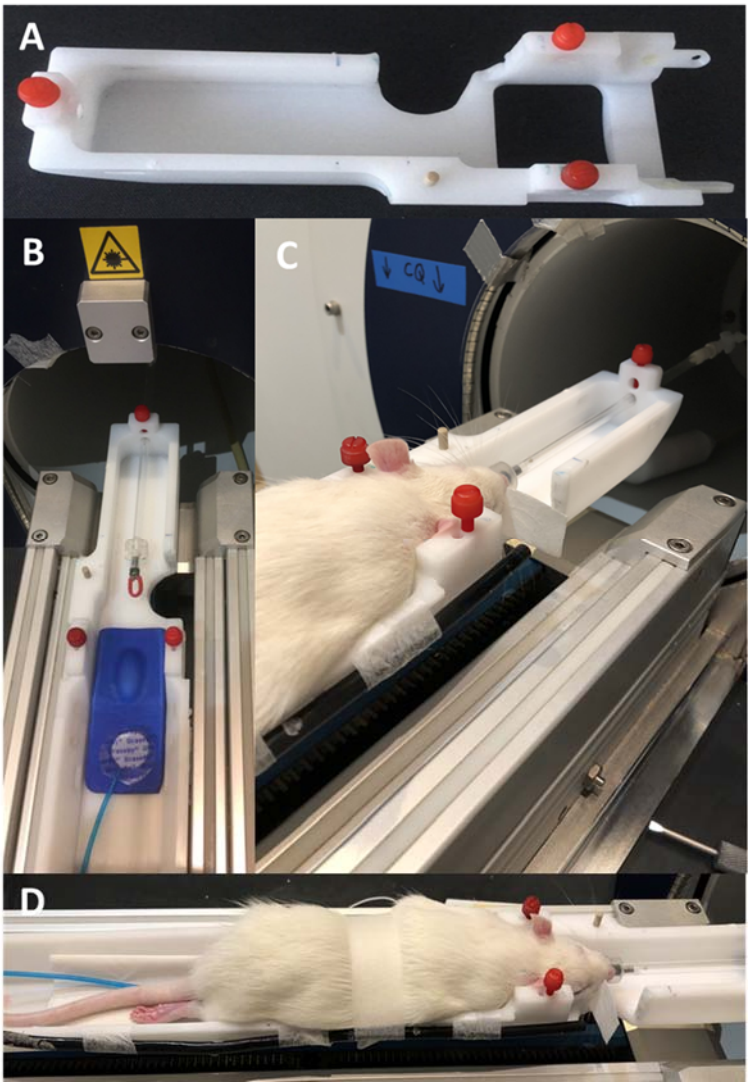



***Figure 12 : (A) Extrémité du lit de l'animal modifiée pour faciliter le mouvement antéro-postérieur de la voile. (B) Installation du repose tête en mousse, du capteur de respiration et du tube d'arrivée d'isoflurane. (C) Positionnement du flexible d'arrivée d'air pulsé le long du banc. (D) Fin de l'installation du rat.***

### 2.4. Système d'air pulsé pour la stimulation des vibrisses

Un premier tuyau flexible (tuyau Gardena) a été raccordé à une source d'air comprimé (1 bar) ainsi qu'à une entrée d'électrovanne de contrôle. Un autre tuyau a été raccordé à la sortie de l'électrovanne et son extrémité placée perpendiculairement à la voile des vibrisses (***Figure 13***). Un boitier électronique fabriqué au laboratoire permet de définir la fréquence de pulsation (8 Hz), la durée de pulsation (20 s) et le temps de repos (10 s). Ces paramètres,

visualisés sur l'écran à cristaux liquides (LCD) du boitier, étaient modifiables *via* les trois potentiomètres analogiques dédiés. Le dispositif électronique contrôlant le paradigme, il devait être d'une grande fiabilité afin d'éviter toute dérive dans les paramètres temporels (pour un post-traitement correct et optimal).

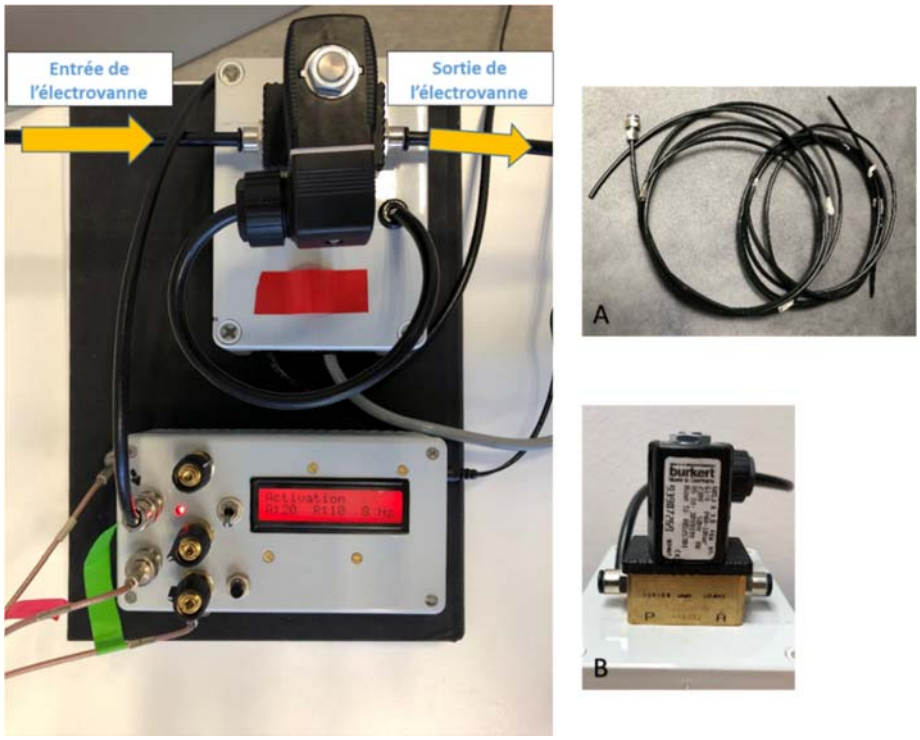



***Figure 13 : Système d'air pulsé pour la stimulation des vibrisses. Un tuyau flexible (A) relie l'air comprimé à l'électrovanne de contrôle (B). Un deuxième tuyau flexible amène l'air pulsé de la sortie de l'électrovanne de contrôle vers le voile. L'électrovanne de contrôle est branchée sur le dispositif de pulsation, qui contrôle le paradigme.***

### 2.5. Installation de l'antenne surfacique (Spectroscopie RMN du proton)

Afin d'obtenir le meilleur signal avec l'antenne de surface (***Figure 14A***), la tête du rat devait être inclinée de 30° par rapport à l'axe perpendiculaire à $B_0$. Le fait de pivoter d'environ 30° dans le sens des aiguilles d'une montre, permettait de positionner l'antenne juste au-dessus de la zone S1BF tout en étant horizontale et située au centre de l'aimant (***Figure 14B***). La tête du rat doit être rasée afin d'améliorer le signal et l'antenne fixée sur la tête du rat avec du ruban adhésif (***Figure 14C***). Lorsque l'antenne était placée au centre de l'aimant, une dernière vérification du déplacement adéquat (mouvement antéro-postérieur, pas de rotation et pas de friction de la voile) de la voile de vibrisses était réalisée grâce à une brève activation du système d'air pulsé.

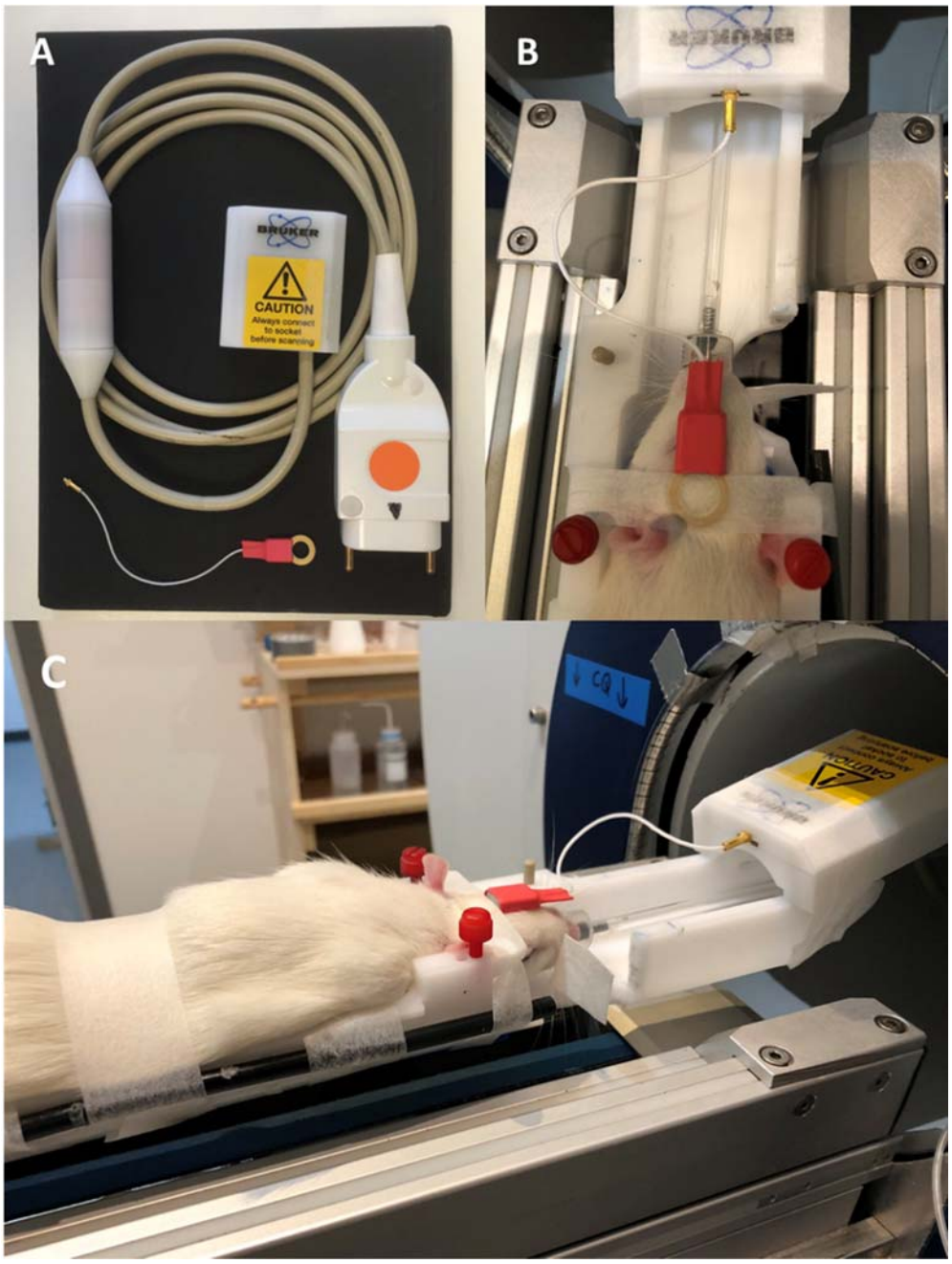



***Figure 14 : (A) Image de l'antenne de surface utilisée dans cette étude. (B) Emplacement de la bobine de surface. (C) Positionnement du rat et de l'antenne avant l'entrée dans l'aimant.***

## 2.6. Installation de l'antenne tête (IRM fonctionnelle)

La tête du rat, en position horizontale cette fois, était maintenue grâce aux barres d'oreille. L'antenne tête a été positionnée et fixée avec du ruban adhésif afin de rester parallèle au champ $B_0$ et couvrir l'intégralité de la tête du rat (***Figure 15***). Tout comme pour l'antenne de surface, lorsque le rat était rentré dans l'aimant et l'antenne se trouvait au centre de l'aimant, une dernière vérification du déplacement adéquat (mouvement antéro-postérieur, pas de rotation et pas de friction sur l'antenne ou le lit) de la voile de vibrisses était réalisée grâce à une brève activation du système d'air pulsé.

***Figure 15 : Positionnement de l'antenne tête. La tête du rat est en position horizontale et bloquée par des barres d'oreille. Vérifiez que la voile se déplace librement et qu'elle n'est pas bloquée par l'antenne ou le lit d'IRM.***

## 2.7. Paramètres utilisés en spectroscopie de RMN du proton

Une séquence de localisation, « Localizer », permettait de vérifier que le rat était bien placé (antenne au centre de l'aimant) pour l'acquisition des données (séquence Localizer : Temps d'échos (TE) = 2,5 ms ; Temps de Relaxation (TR) = 100 ms ; moyenne = 1 ; répétition = 1 ; coupe = 1 mm ; taille de l'image = 256 x 256 ; champs de vision = 50 x 50 mm ; durée du scan = 12 s 800 ms). Ensuite, une séquence T2_TurboRARE (TE 100 ms ; TR 5000 ms ; 14 coupes de 2 mm ; champs de vision 2,5 x 2,5 cm ; matrice 128x128 ; durée de la séquence = 2 min 40 s) permettait d'obtenir des images anatomiques, utiles pour une localisation très précise de la zone S1BF. À partir d'un atlas du cerveau de rat et des données anatomiques, le monovoxel (hauteur 2 mm, largeur 2,5 mm, profondeur 3 mm) pouvait se placer précisément dans le barrel cortex gauche, zone d'intérêt puisqu'activée par la stimulation des vibrisses droites. De légères modifications de l'impédance de l'antenne ont permis de l'accorder.

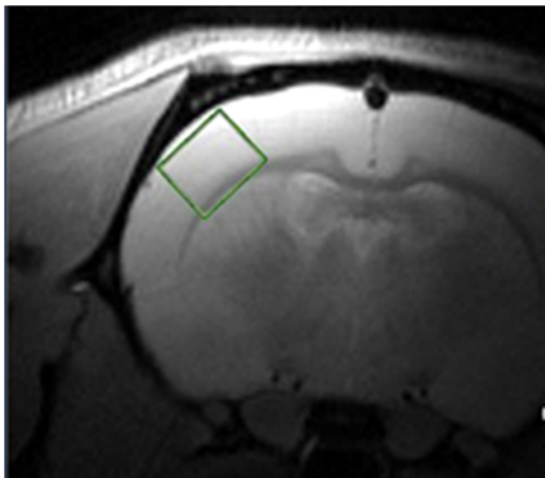


***Figure 16 : Localisation du voxel au niveau de la zone S1BF pour les acquisitions de SRM.***

Ensuite, une carte $B_0$ (Premier TE = 1,65 ms ; TR = 20 ms ; moyenne = 1 ; angle de bascule = 30° ; espacement des échos = 3,805 ms ; coupe = 58 mm ; taille de l'image = 64 x 64 x 64 mm ; champs de vision = 58 x 58 x 58 mm ; durée du scan = 1 m 24 s 920 ms) était acquise afin d'acquérir une carte de $B_0$ qui sera utilisée pour le shim. D'abord un scan shim (excitation sélective du voxel : STEAM (stimulated echo acquisition mode), impulsion gaussienne : TE = 5 ms ; temps de mélange = 10 ms ; durée de l'acquisition = 204,8 ms ; bande passante = 10000 Hz ; temps d'échantillonnage = 50 µs) puis un local shim (suppression du signal de l'eau de type VAPOR, durée d'acquisition = 1363,15 ms ; nombre de points = 4096 ; bande passante = 3004,81 Hz ; bande passante = 10 ppm ; temps d'échantillonnage = 166,40 µs ; résolution spectrale = 0,37 Hz/points ; durée de l'acquisition = 1363,15 ms) et enfin la séquence LASER (TE = 19,26 ms ; TR = 2500 ms ; nombre de points = 4096 ; moyenne = 128 ou 32 ; durée du scan = 5 min 20 s ou 1 min 20 s) ont permis les derniers réglages de l'homogénéité du champ puis l'acquisition des données de spectroscopie proton RMN *in vivo*.

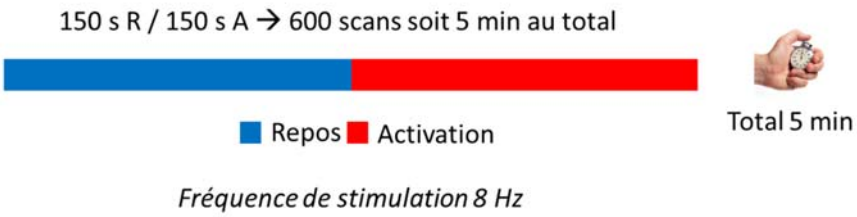
### 2.8. Paramètres utilisés en IRM fonctionnelle

L'antenne de surface était remplacée par l'antenne tête puis le rat était réintroduit au centre de l'aimant, une séquence Localizer a de nouveau été utilisée, afin de vérifier le positionnement de l'antenne au centre de l'aimant (TE = 2,5 ms ; TR = 100 ms ; moyenne = 1; répétition = 1 ; coupe = 1 mm ; taille de l'image = 256 x 256 ; champs de vision = 50 x 50 mm ; durée du scan = 12 s 800 ms). Ensuite, une carte $B_0$ (Premier TE = 1,65 ms ; TR = 20 ms, moyenne = 1; angle de bascule = 30°; espacement des échos = 3,805 ms ; coupe = 58 mm ; taille de l'image = 64 x 64 x 64 mm ; champs de vision = 58 x 58 x 58 mm ; durée du scan = 1 m 24 s 920 ms) était acquise afin d'acquérir une carte de $B_0$ qui sera utilisée pour le shim. D'abord un scan shim (excitation sélective du voxel : STEAM (stimulated echo acquisition mode), impulsion gaussienne : TE = 5 ms ; temps de mélange = 10 ms ; durée de l'acquisition = 204,8 ms ; bande passante = 10000 Hz ; temps d'échantillonnage = 50 µs) puis la séquence T2_Star_FID_EPI (TE = 16,096 ms ; TR = 500 ms ; moyenne = 1 ; répétition = 600 ; coupe = 1 mm ; 4 coupes consécutives ; taille de l'image = 128 x 128 ; champs de vision = 20 x 20 mm ;

bande passante = 333333,3 Hz ; durée du scan = 5 min 00 s) ont été utilisés pour l'obtention des données d'IRMf.

## 3. Paradigme

Le but a été d'optimiser le paradigme utilisé pour l'étude *in vivo* en améliorant le rehaussement du signal positif détecté dans le cortex gauche par IRMf en modulant les paramètres du paradigme. Le premier paradigme testé a été le suivant :




Il se composait de deux parties distinctes : une période de repos suivi d'une période d'activation continue, chacune durant 2 min 30s. Les résultats obtenus à partir de ce paradigme sont présentés dans la ***Figure 17***.

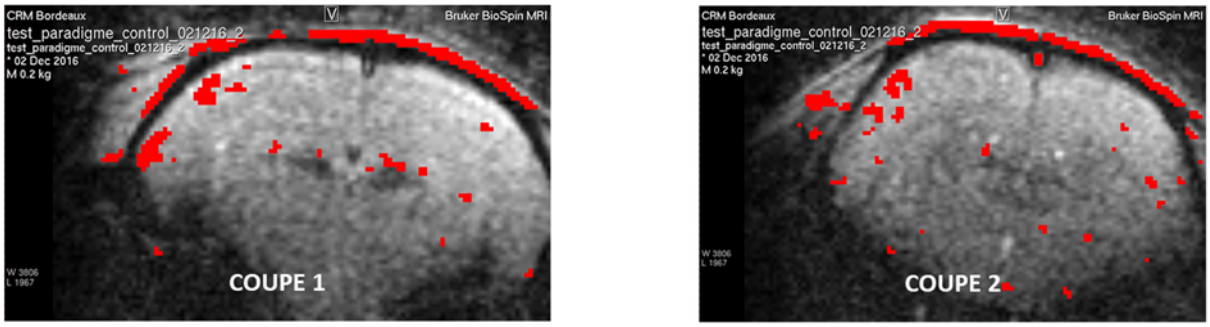



***Figure 17 : Visualisation typique de l'activité cérébrale au niveau de la zone S1BF, chez le rat, après une période de repos suivi d'une période d'activation de 2 min 30s chacune.***

Sur 2 coupes consécutives passant par la zone S1BF, un signal positif est détecté dans le cortex gauche. Le but était d'améliorer le rehaussement du signal. Il est vrai que des erreurs peuvent survenir car la sélection des tranches est souvent difficile à contrôler entre animaux, ce qui entraîne un degré variable d'effet de volume partiel entre animaux. C'est pour cette raison que nous positionnons nos coupes en série de 5 coupes, centrées sur la zone S1BF (***Figure 17***). Selon les données de Silva *et al.*, un paradigme avec des périodes d'activation plus courtes, alternées avec des périodes de repos permet une meilleure activation cérébrale, détectable en IRMf [60]. Différents paradigmes ont été testés (***Figure 18***). En faisant une étude comparative qualitative, notre choix de paradigme s'est porté vers une alternance de 20s d'activation et 10s de repos : 10x20s A / 10x10s R pour 600 scans soit une durée de 5 min 00 s. Dans la partie suivante, une étude sur des rats contrôles a été menée.

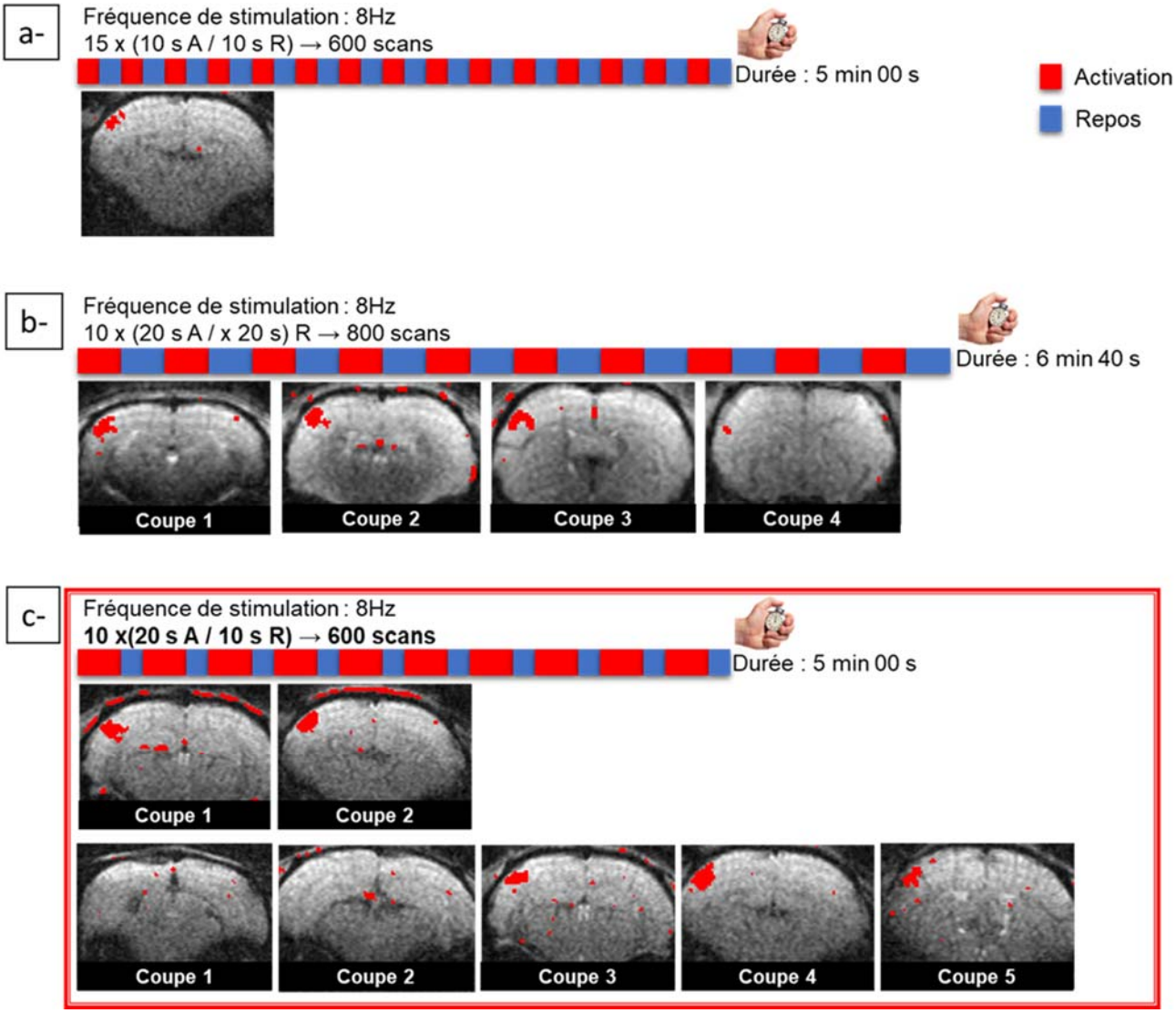
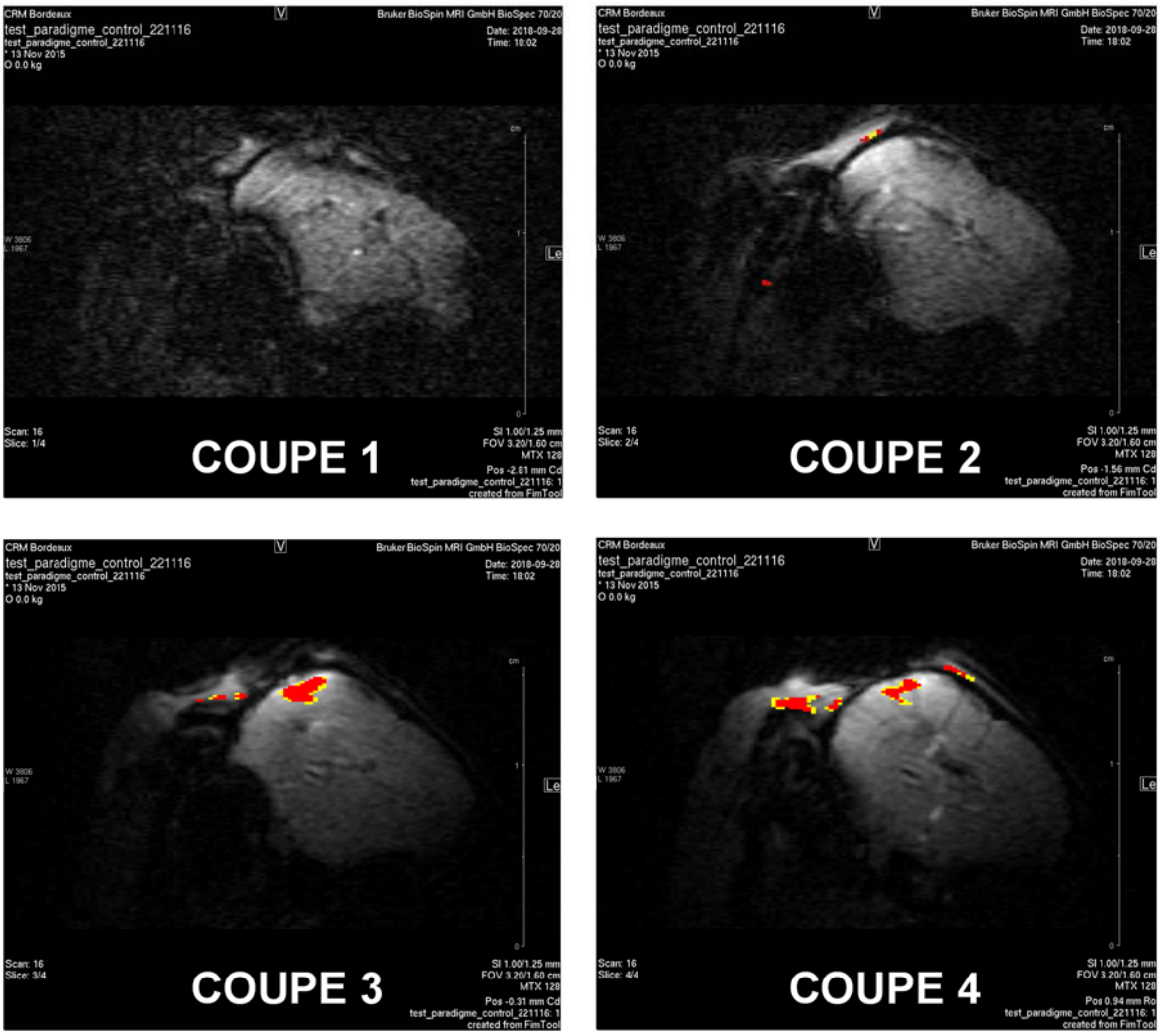
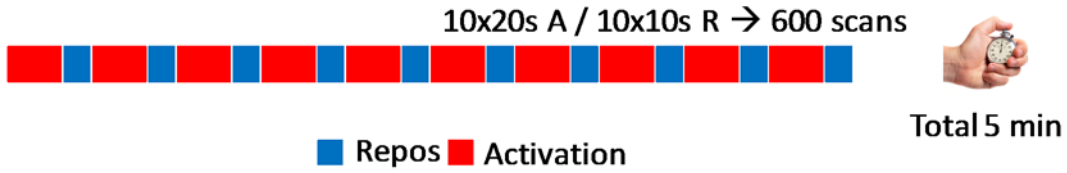



***Figure 18 : Test des différents paradigmes de stimulation des vibrisses. (a) paradigme composé de 15 répétitions d'une période d'activation de 10 s suivie d'une période de repos de 10 s, (b) paradigme composé de 10 répétitions d'une période d'activation de 20 s suivie d'une période de repos de 20 s, (c) paradigme composé de 10 répétitions d'une période d'activation de 20 s suivie d'une période de repos de 10 s.***

Note : Des résultats d'IRMf acquis à l'aide de l'antenne de surface 10 mm avec le paradigme 10x20 s A / 10x10 s R pour 600 scans ont aussi été acquis (***Figure 19***). Le fait de ne pas pouvoir comparer le signal obtenu dans le barrel cortex droit par rapport à celui du barrel cortex gauche nous a engagé à utiliser l'antenne tête pour la partie IRMf. Le résultat dépend beaucoup du positionnement du rat qui se devait d'être placé à 30° de l'axe perpendiculaire à $B_0$ afin que l'antenne de surface soit juste au-dessus du barrel cortex et améliore nettement la réception du signal.




Paradigme d'activation choisi et utilisé dans les études *in vivo*
*Fréquence de stimulation 8 Hz*

***Figure 19 : Résultat d'IRMf obtenu avec l'antenne de surface 10 mm et le même paradigme choisi figure 18.***

## 4. Résultats des quantifications BOLD sur les rats contrôles

Grâce à l'IRMf, l'activité cérébrale a pu être enregistrée. Une réponse hémodynamique transitoire, provoquée par l'activité neuronale suite à la stimulation des vibrisses (couplage neurovasculaire) a été détectée.

Comme développé dans la partie précédente, le paradigme spécifique, A(20s) / R(10s) 600 scans (8 Hz), a été utilisé pour provoquer une réponse hémodynamique ou activation cérébrale chez l'animal. L'expérience d'IRMf a reposé dans un premier temps dans la conception précise d'un paradigme efficace permettant de visualiser la zone S1BF activée. En effet, la stimulation des vibrisses droites à l'aide du système d'air pulsé, a engendré un signal positif de BOLD dans le cortex gauche au niveau du champ des tonneaux du cortex somatosensoriel. Un rehaussement du signal positif a été détecté pour 8 rats sur 8 (2 à 3 BOLD par rat), alors que seul le bruit de fond était détecté dans les hémisphères droits. Lorsque l'IRMf BOLD a été réalisée sans stimulation des vibrisses, aucun rehaussement du signal n'a pu être observé ni dans le S1BF gauche ni dans le droit. On peut en conclure que le dispositif d'air pulsé combiné au paradigme a donc permis de créer de manière fiable une stimulation responsable d'une activation cérébrale.

Concernant l'analyse des données IRMf, une approche standard a impliqué l'extraction du signal à partir de régions d'intérêt spécifiées (ou ROIs). La première étape de l'analyse des données d'IRMf a consisté à créer une carte statistique de seuils permettant le seuillage des images et ainsi la mise en évidence des zones cérébrales activées. Ce premier procédé a permis, de manière qualitative, de visualiser le signal BOLD et de vérifier sa localisation anatomique (au niveau de S1BF). Pour une quantification qualitative (activation ou pas d'activation), le seuillage était suffisant. Cependant, la mise en place d'un post-processing s'est avérée utile pour obtenir des données quantitatives de l'activation cérébrale.

Les données BOLD ont été quantifiées à l'aide du logiciel FUN tool de Paravision 6.0.1. La ***Figure 20*** présente la fenêtre principale « Image display and processing » où est affiché un exemple typique d'une coupe du cerveau du rat dont la zone S1BF est activée (pixels rouges) ainsi que les différents ROIs utilisées pour la quantification de l'activation cérébrale. Les paramètres d'affichages, l'échelle, et la jauge de seuillage du signal ont permis une vue d'ensemble des résultats de l'IRMf. Dans un premier temps, la fenêtre « FUNctional Controller » a permis l'accès à d'autres composants d'interface graphique permettant la modification du paradigme défini, l'application ou non de filtres de pré et/ou post processing, le réglage du seuil en amont de l'affichage d'une carte statistique ou le positionnement les ROIs. La fenêtre « Select protocol » exposait les détails du paradigme choisi et permettait de modifier les différents paramètres. Les fenêtres « Preprocessing » et « Postprocessing » permettaient l'application de différents filtres. Afin de quantifier l'intensité du signal dans différentes zones du cerveau, les ROIs étaient positionnées et la jauge de seuillage était utilisée afin d'optimiser la visibilité des variations d'intensité du signal BOLD dans l'espace 2D de la coupe. L'histogramme de la ROI sélectionnée apparaissait dans la fenêtre « Region of

Interest Tool » accompagné de l'intégrale, la moyenne, le minimum ainsi que le maximum en cm² et en unité de pixel. Un tableau récapitulatif des résultats de chaque ROI était créé dans la fenêtre « Parameter Output Tool » et utilisé pour les tests statistiques.

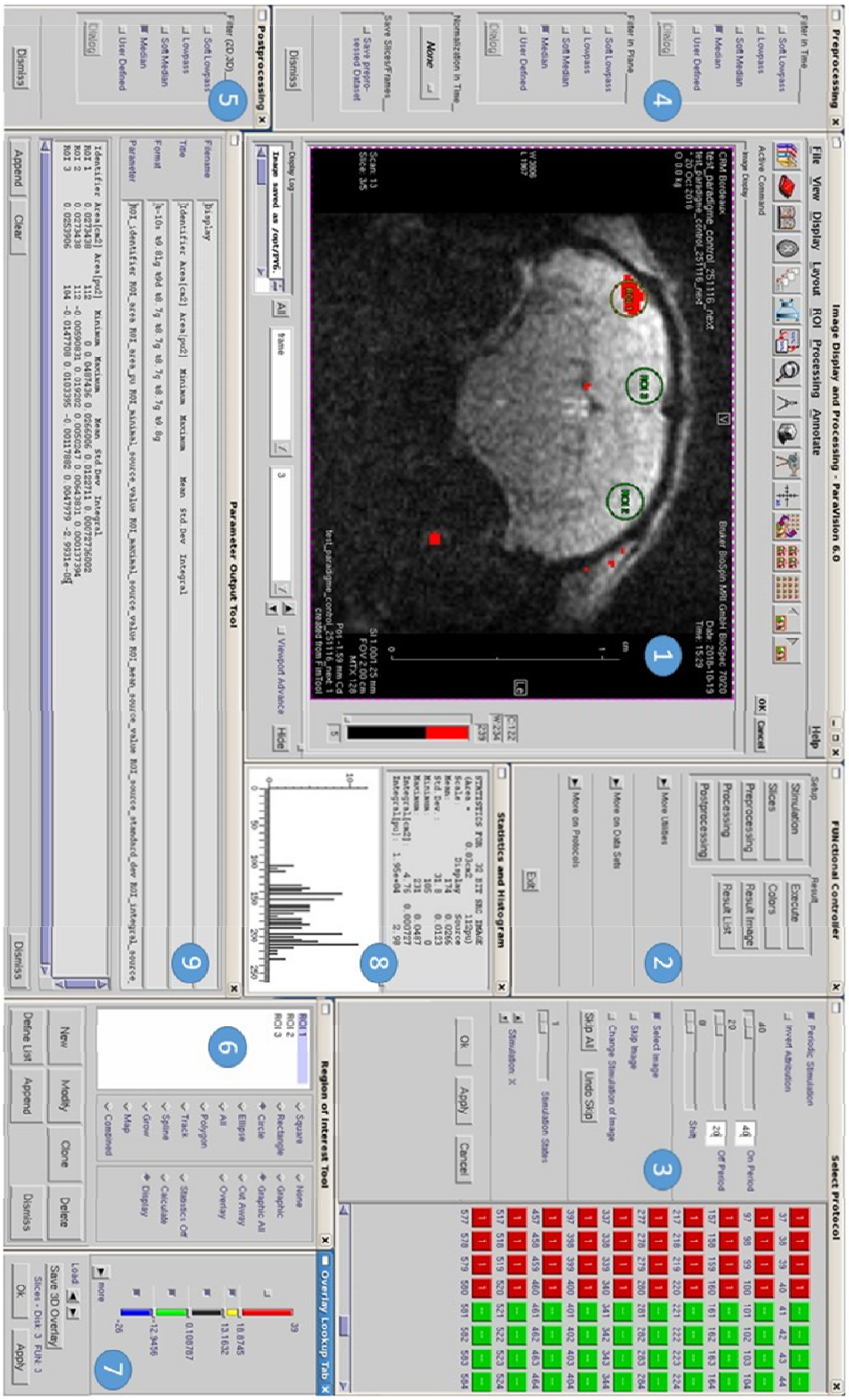



*Figure 20 : Interface graphique de FUN tool permettant le traitement des données IRMf.*

La ***Figure 21*** expose la valeur d'intensité maximale associée à un pixel de chaque ROI, la valeur de l'intensité moyenne par ROI ainsi que l'intégrale des intensités pour chaque ROI. Un test ANOVA (ANalysis Of VAriance) de type Fisher LSD à un facteur de variabilité a été utilisé. Quelles que soit les variables considérées, les valeurs de la ROI1 (zone activée S1BF) sont significativement supérieures à celles des deux autres ROIs.

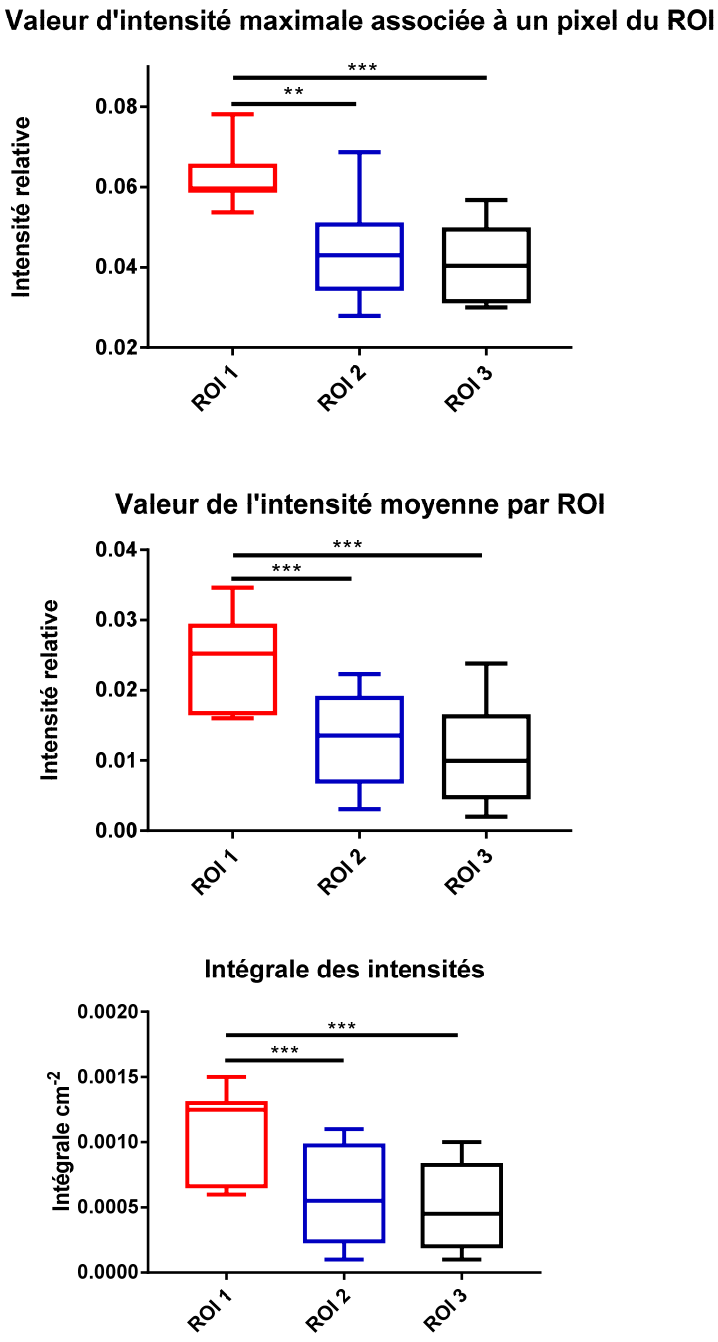



***Figure 21 : Statistiques des mesures du signal BOLD pour chaque rat (n = 8) avec une coupe analysée par rat.***
***** p < 0,0005 et *** p < 0,0001***

La ***Figure 22*** expose 8 coupes typiques de cerveaux de rats où l'activation cérébrale y est visible dans la zone S1BF. Le positionnement des ROIs y est aussi montré. Il s'agit des rats contrôles sur lesquels la quantification a eu lieu.

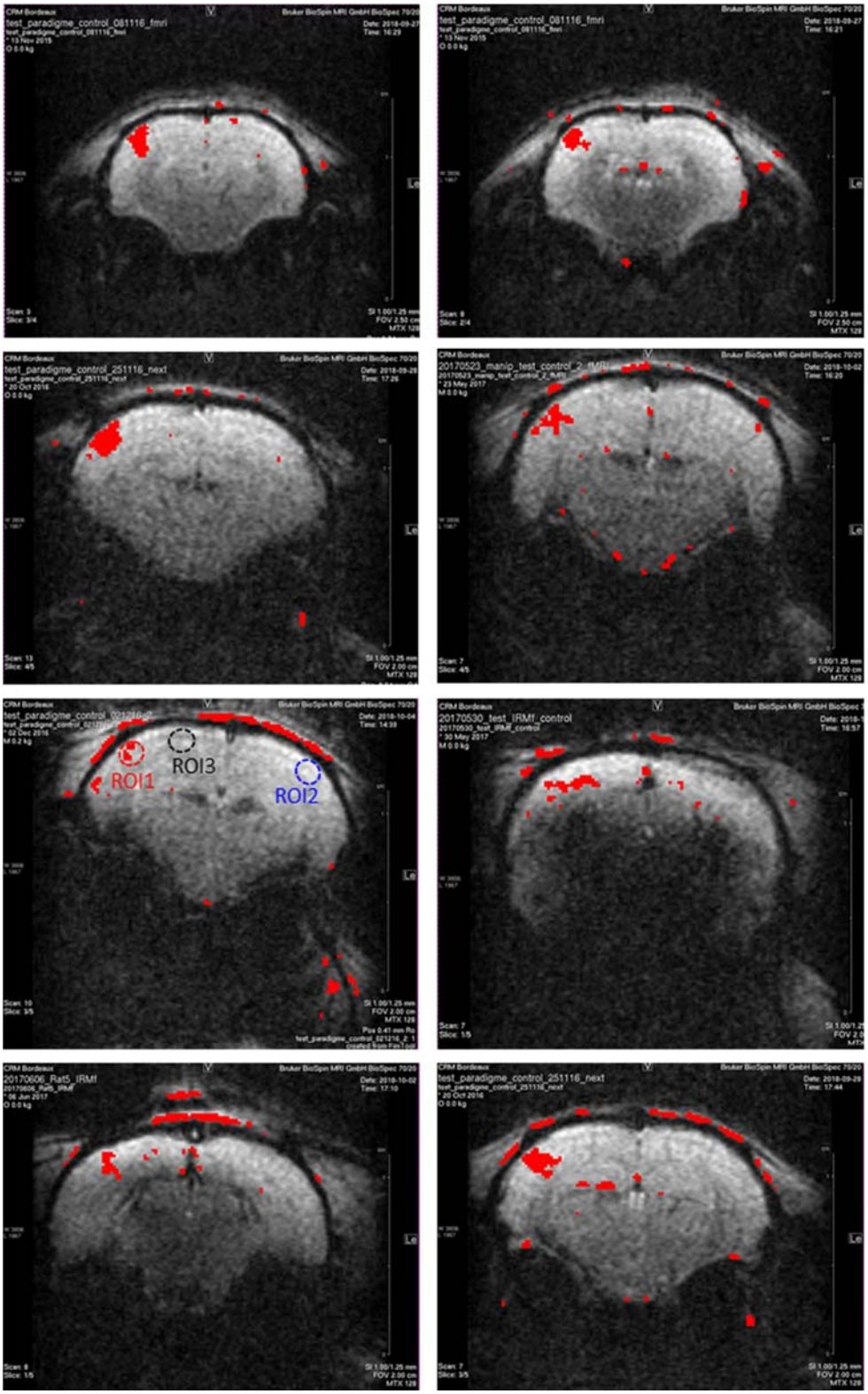



***Figure 22 : IRMf de différents rats dont les coupes sont centrées sur le S1BF. Le ROI1 correspond à la zone S1BF activée, le ROI2 à la zone S1BF non activée en controlatéral et le ROI3 à une zone corticale mesurant le bruit.***

# 5. Résultats de spectroscopie sur les rats contrôles

Juste avant mon arrivée au laboratoire et au tout début, les premières expériences de spectroscopie *in vivo* ont été acquises avec séquence PRESS. Cependant, le rapport signal sur bruit était mauvais et le pic de lactate était difficilement, voire impossible, à quantifier par LCModel car non différenciable du pic des lipides. Afin de rentabiliser ces données acquises *in vivo*, j'ai passé les premiers mois de ma thèse à mettre au point un pipe-line pour le post-processing des données PRESS, afin de pouvoir quantifier le lactate, et les mois suivants ont été passés à améliorer l'acquisition (changement de séquence de la PRESS à la LASER, tests de différentes antennes de surface, etc.…). Un grand merci à Julien Valette qui m'a initié à l'utilisation de ce logiciel et qui m'a donné, entre autre, les données de macromolécules pour sa base de données et qui nous a fourni la séquence LASER est ses paramètres.

## 5.1. Pipeline pour quantification des spectres PRESS

L'objectif a été de développer un pipeline permettant une quantification efficace et robuste sur un échantillon de spectres recueillis avec une séquence PRESS et pour lesquels le lactate n'était pas quantifiable par LCModel. Une technique d'apodisation consistant à multiplier les spectres bruts par une fonction de pondération exponentielle, soit un filtre ajusté d'élargissement de raies, a été appliquée. Une étude comparative des quantifications avec ou sans multiplication par le filtre ajusté a été effectuée.

Les acquisitions PRESS ont été réalisées avant les mises au point que j'ai réalisé. Elles ont été faites sur des rats Wistar RjHan avec un aimant Bruker Biospec 70/20 à 7T. Une antenne de surface (diamètre intérieur de 10 mm, Bruker) a été utilisée pour la réception du signal. La stimulation des vibrisses a été effectuée directement dans l'aimant à l'aide du même système à impulsions d'air mais avec une fréquence de 5 Hz et une stimulation en continu des vibrisses. Afin de placer correctement le voxel dans la zone S1BF, une séquence pondérée en $T_2$ a été réalisée au préalable (séquence RARE) : 16 tranches de 1 mm d'épaisseur, FOV 5 x 5 cm. Un voxel a ensuite été localisé dans la zone S1BF (2 x 2,5 x 3 mm) et la spectroscopie proton *in vivo* a été réalisée soit au repos, soit pendant l'activation continue des vibrisses à l'aide d'une séquence PRESS (TE 20 ms, TR 2 500 ms, 32 scans, FWHM 14 ± 1 Hz).

Les étapes de post-traitement ont été réalisées à l'aide d'IGOR WaveMetrics et la création des fichiers .control et .RAW à l'aide d'Excel. Ces fichiers ont été lus par LCModel afin de résoudre le problème linéaire inverse mal posé donnant comme résultat la décomposition spectrale et la valeur des concentrations des différents métabolites d'intérêt. Un schéma détaillant le pipeline utilisé est présenté ***Figure 23***.

Pour la première étape du pipeline, les données brutes sont lues sous IGOR WaveMetrics. Ensuite, l'application d'un filtre d'élargissement de ligne aux données brutes crée une apodisation du signal reçu dans le domaine temporel. Dans le domaine fréquentiel, le rapport signal sur bruit diminue mais la largeur à mi-hauteur des pics augmente. Pour une

exponentielle décroissante de la forme $e^{-\pi.LB.t}$, l'objectif est de changer la valeur du temps de relaxation $T_2^*$ en une nouvelle valeur $T_2^*$ ' donnée par:
$\frac{1}{T2*'} = \frac{1}{T2*} + \pi.LB$ où LB est le facteur d'élargissement en Hz. La queue du FID filtré doit être égale à zéro, le LB doit être dans ce cas ≥ $\frac{5}{\pi N \Delta t}$

où N est le nombre de points correspondant à la FID et Δt est le temps d'échantillonnage en secondes. N est proportionnel à $\sqrt{BW}$ (BW : Bandwidth), ce qui signifie que si Δt augmente, N diminue et le rapport signal sur bruit augmente. En revanche, l'apodisation ne peut compenser un mauvais shim ou un temps d'acquisition insuffisant.
Le LB doit être inférieur à la largeur à mi-hauteur du shim et supérieur ou égal à $\frac{5}{\pi N \Delta t}$.

Notre choix s'est donc porté vers un LB de 2,5 Hz.

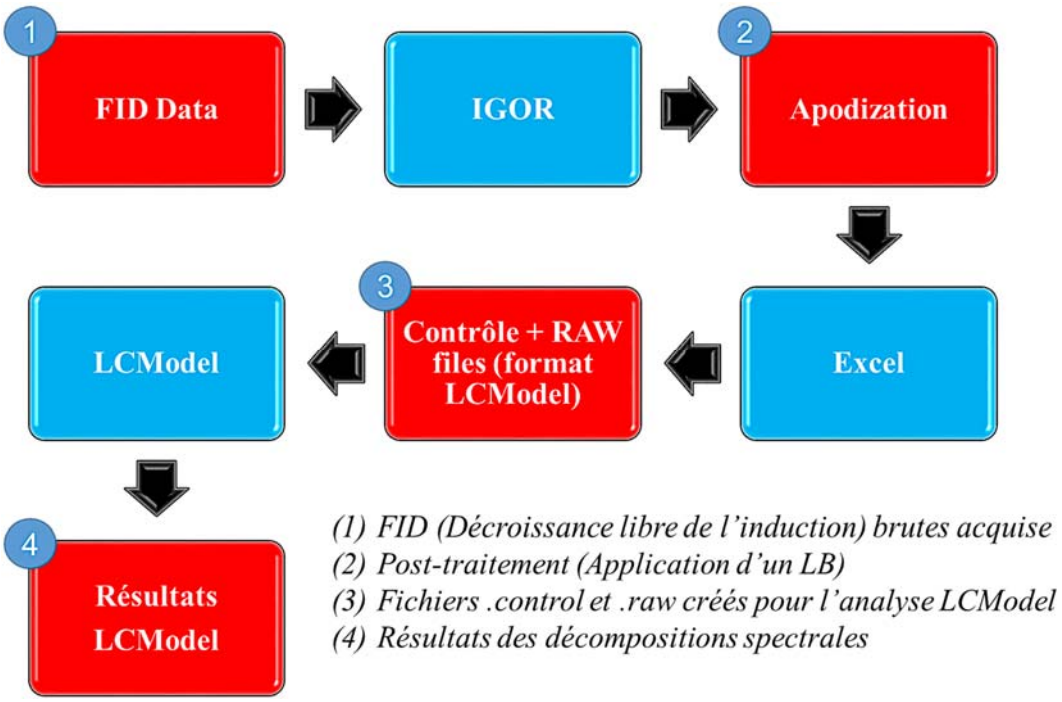



***Figure 23 : Pipeline pour permettre la quantification du lactate par LCModel à partir de données brutes issues d'une séquence PRESS.***

Dans une troisième étape, les données brutes filtrées sont recopiées dans un fichier .raw. Ce fichier est écrit dans une structure stricte afin d'être lu correctement par LCModel. Il contient les paramètres d'acquisition primordiaux présents en début de fichier, suivis des données brutes filtrées. Dans un même temps, un fichier .control est conçu, recueillant l'intégralité des paramètres. Par exemple, dans le fichier .control figurent : Δt = 3.280e-04 s, dktmn = 0.65, echot = 20 ms, hzppm = 300.3331 Hz, nunfil = 2048, ppmend = 0.2 ppm, ppmst = 4.0 ppm, wconc = 43300. Δt est le temps d'échantillonnage ou l'inverse de la bande passante. dktmn est une interpolation qui contrôle l'espacement des noeuds pour l'ajustement de la ligne de base afin de donner une forme lisse et stable. echot correspond au temps d'écho. hzppm est l'intensité du champ, en termes de fréquence de résonance du proton en MHz. nunfil est le nombre de paires de nombres complexe (N). ppmend et ppmst permettent de cibler une plage

de déplacement chimique dans laquelle la déconvolution sera effectuée. wconc est un paramètre de correction de concentration des métabolites :

$$wconc = \frac{43300\, fgm \,+\, 35880\, fwm \,+\, 55556\, fcsf}{1 - fcsf}$$

S1BF est une zone située dans la matière grise. Les valeurs de fwm et fcsf, fractions de matière blanche et de fluide cérébro-spinal, ont été fixées à 0.

Un test statistique pour comparer la quantification du lactate avec et sans LB a été réalisé (***Figure 24A***). Le premier graphe affiche les résultats d'un t-test non apparié : les moyennes des concentrations de lactate quantifiées avec LCModel, avec ou sans LB n'ont montré aucune différence significative. La valeur des % CRLB et CRLB s.d étaient cependant significativement différentes. Ce pipeline a permis une quantification robuste du lactate à partir de données de spectres issus d'une séquence PRESS de 32 scans, habituellement quantifié par LCModel avec un CRLB > 15 %, considéré comme non fiable. L'utilisation de cette méthode a permis de diminuer les valeurs de CRLB sans que les moyennes des concentrations de lactate relatives par rapport à la créatine, avec ou sans LB, n'aient montrés de différences significatives.

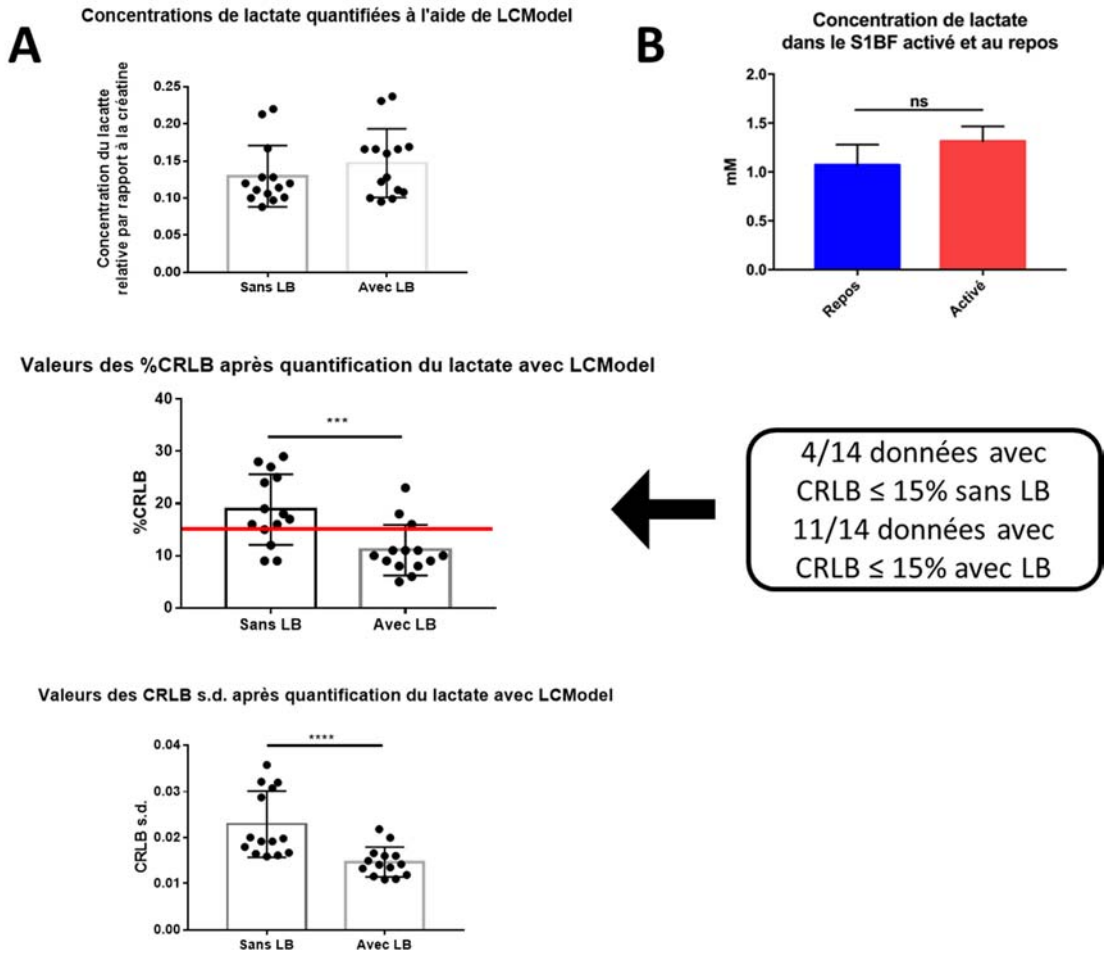



***Figure 24 : (A) Données statistiques concernant la quantification du lactate via LCModel avec ou sans Line-Broadening (n=14). La barre rouge représente le seuil acceptable pour le % CRLB. (B) Résultats des concentrations en lactate obtenus par LCModel après application des LB sur les spectres PRESS.***

L'utilisation de ce pipeline a permis de quantifier par LCModel les quantités de lactate sur les spectres PRESS (***Figure 24B***) acquis au repos et pendant la stimulation des vibrisses mais n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation statistiquement significative de lactate. J'ai donc entrepris de travailler sur l'amélioration de l'acquisition des spectres *in vivo*.

### 5.2. Comparaison PRESS Vs LASER

La séquence la plus standard de spectroscopie localisée par RMN du proton *in vivo* est la séquence PRESS. Elle applique une impulsion d'excitation sélective de 90° et deux impulsions de refocalisation à 180°. Elle permet de sélectionner dans les trois directions de l'espace le volume d'intérêt. Les trois tranches sélectionnées sont perpendiculaires. La séquence PRESS conserve la totalité de l'amplitude du signal mais, en fonction du champ $B_1$ et des impulsions RF, les temps d'écho minimaux peuvent devenir trop longs pour obtenir le signal de certains métabolites avec des temps de relaxation $T_2$ très courts. De plus, l'artefact de déplacement chimique est particulièrement problématique pour la refocalisation des impulsions. Ces deux effets deviennent davantage problématiques avec l'augmentation de la force du champ magnétique.

L'inhomogénéité spatiale du champ $B_1$ a une influence sur les angles de basculement qui eux aussi peuvent être inhomogènes dans le volume d'intérêt. La séquence LASER a donc été testée [61]. Je tiens à remercier Julien Valette, qui a développé cette séquence et qui a pu être implantée dans le 7T du CRMSB. La séquence LASER est une séquence où un écho de spin est également enregistré. L'impulsion RF de 90° est cependant remplacée par une impulsion adiabatique non sélective appelée AHP pour Adiabatic Half Passage. Pour obtenir une localisation 3D, trois paires d'impulsions adiabatiques nommées AFP pour Adiabatic Full Passage sélectionnent trois tranches perpendiculaires. Les deux impulsions de chaque paire sélectionnent la même tranche. La deuxième impulsion AFP de chaque paire recentre la phase non linéaire sur la tranche introduite par la première impulsion AFP. Les avantages de cette séquence sont une tolérance élevée à l'inhomogénéité $B_1$ et aux variations du déplacement chimique.

Une comparaison de spectres obtenus avec ces deux séquences a été réalisée. Le spectre en bleu est un spectre typique issu d'une séquence PRESS (64 scans, TR = 2500 ms, TE = 16,13 ms, VOI = 15mm$^3$) et le spectre en rouge est un spectre typique issu d'une séquence LASER (64 scans, TR = 2500 ms, TE = 19,26 ms, VOI = 15mm$^3$). Dans un premier temps, les spectres ont été calés sur le pic de l'eau (***Figure 25***) puis sur le pic de NAA (***Figure 26***). Le pic de NAA issu de la séquence PRESS a une largeur à mi-hauteur de 20,76 Hz et le pic de NAA issu de la séquence LASER a une largeur à mi-hauteur de 9,52 Hz. Toujours en gardant le pic de NAA comme référence, le rapport signal sur bruit du spectre issu de la séquence LASER est de 44,63 et celui du spectre issu de la séquence PRESS est de 14,49.

Pour le reste de l'étude *in vivo*, notre choix s'est porté vers sur la séquence LASER.

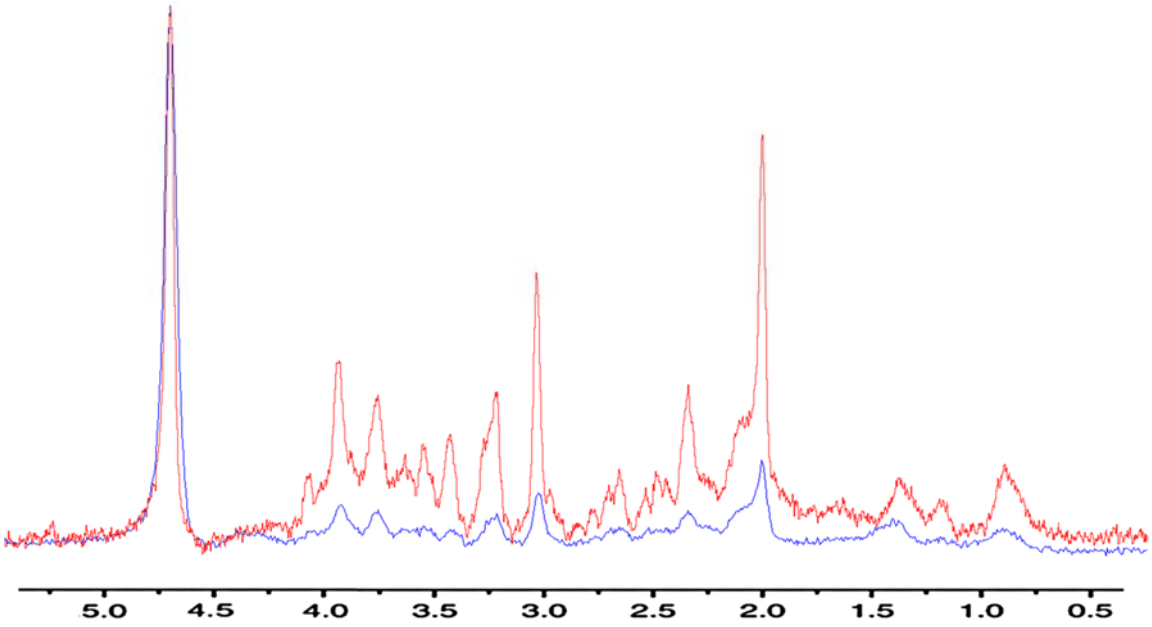



***Figure 25 : Spectre LASER en rouge (64 scans, TR = 2500 ms, TE = 19,26 ms, VOI = 15mm$^3$) et spectre PRESS en bleu (64 scans, TR = 2500 ms, TE = 16,13 ms, VOI = 15 mm$^3$) normalisés par le résidu du pic d'eau.***

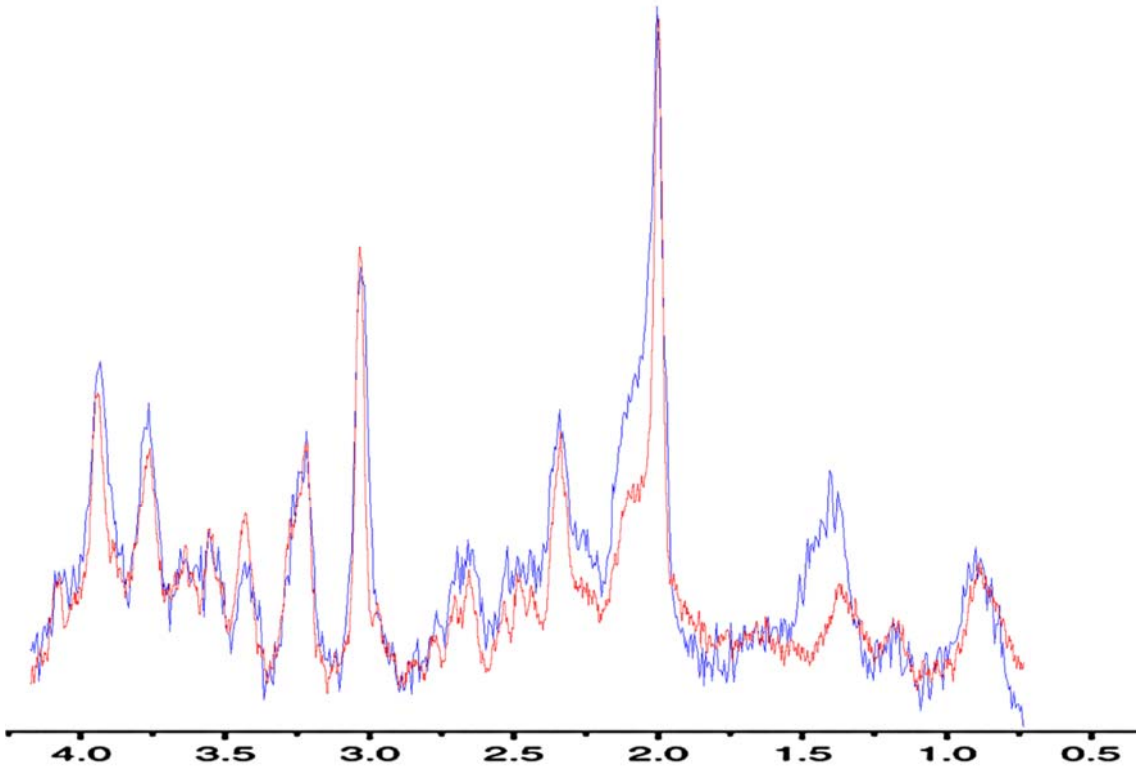



***Figure 26 : Spectre LASER en rouge (64 scans, TR = 2500 ms, TE = 19,26 ms, VOI = 15mm$^3$) et spectre PRESS en bleu (64 scans, TR = 2500 ms, TE = 16,13 ms, VOI = 15 mm$^3$) normalisés par le pic du NAA (2,01 ppm).***

### 5.3. Comparaison des antennes de surface (7 mm Vs 10 mm)

Dans cette partie, le but était d'améliorer la technique de détection du lactate. En effet, l'amélioration de la résolution spectrale, du rapport signal sur bruit (RSB) et la limitation du signal provenant des lipides extra-crâniens, étaient les éléments majeurs à perfectionner. En effet, la localisation du S1BF, au bord du cortex et donc proche de la peau du crâne a été problématique du fait de la contamination par les lipides.
Afin d'obtenir un signal suffisant qui émerge du bruit de fond, il nous fallait améliorer le RSB ainsi que la largeur à mi-hauteur des pics de métabolites d'intérêt favorisant une quantification optimale. Le signal provient du positionnement du monovoxel ainsi que de la séquence d'impulsion. Le rat a donc été positionné afin de permettre une localisation idéale du monovoxel, sans contamination de la peau et d'être perpendiculaire au champ $B_0$. La séquence LASER, utile pour limiter le signal provenant des lipides extra-crâniens qui compliquent l'analyse des spectres intracérébraux notamment autour de la gamme fréquentielle 0,5-2,0 ppm (contamination du lactate à 1,32 ppm) a été utilisée. L'objectif était de comparer deux antennes. Les paramètres suivants ont été utilisés : TE = 20 ms, TR = 2500 ms. Seul le nombre de scans a varié.
Afin d'augmenter le RSB, deux antennes ont été testées et comparées sur différents fantômes ainsi que sur l'animal : une antenne surfacique de 7mm (***Figure 27***) et une de 10 mm. Le RSB était augmenté pour les tissus adjacents aux solénoïdes de l'antenne surfacique et était plus élevé pour la bobine de diamètre 10 mm que pour la bobine de diamètre 7 mm (***Figure 28*** et ***Tableau 2***). De plus, l'antenne 7 mm entraînait une perte de sensibilité comparée à l'antenne 10 mm. Une sensibilité élevée et le meilleur RSB devaient être choisis. Pour la suite de l'étude, notre choix a été de favoriser l'antenne 10 mm. Pour l'antenne 7 mm, il pourrait être intéressant de mener, *in vivo,* une étude plus invasive en insérant l'antenne en sous-cutané, juste au-dessus de la zone S1BF, pour réduire la profondeur de détection tout en gardant une sensibilité intéressante.

***Figure 27: Antenne de surface 7 mm et bloc de réglage de correspondance d'impédance.***

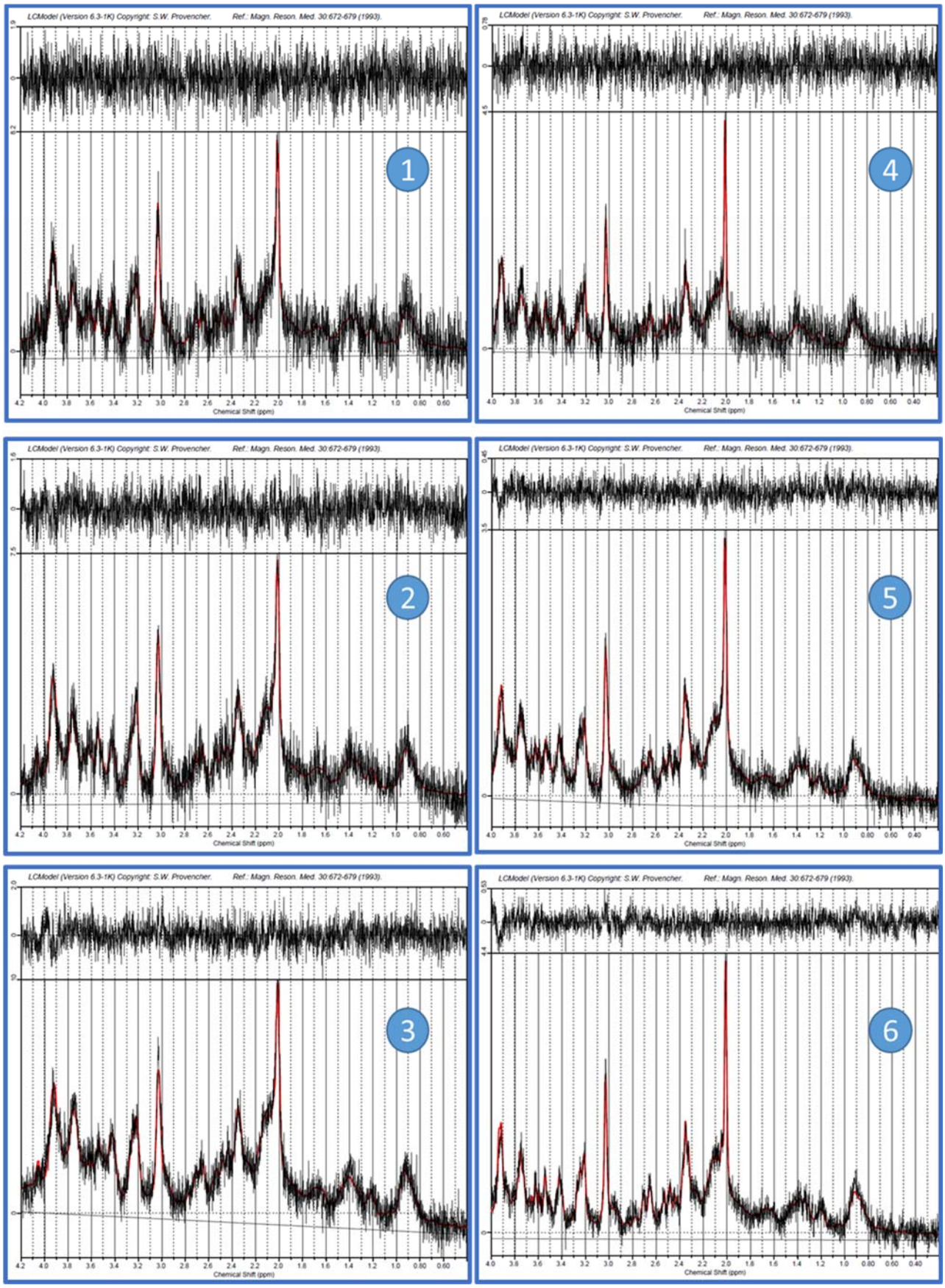



***Figure 28 : Spectres enregistrés avec l'antenne 7 mm (1: 32 scans, 2: 64 scans, 3: 128 scans) et spectres enregistrés avec l'antenne 10 mm (4 : 32 scans, 5 : 64 scans, 6 : 128 scans).***

| | Antenne | Nombre de scans | S/B | Lac (u.a) | %CRLB | Cr+PCr (u.a) | Lac/Cr+PCr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Spectre 1 | 7 mm | 32 | 6 | 0,209 | 24 | 1,355 | 0,154 |
| Spectre 2 | 7 mm | 64 | 9 | 0,223 | 16 | 1,363 | 0,163 |
| Spectre 3 | 7 mm | 128 | 11 | 0,236 | 17 | 1,736 | 0,136 |
| Spectre 4 | 10 mm | 32 | 9 | 0,071 | 25 | 0,488 | 0,158 |
| Spectre 5 | 10 mm | 64 | 14 | 0,124 | 10 | 0,472 | 0,269 |
| Spectre 6 | 10 mm | 128 | 17 | 0,101 | 8 | 0,479 | 0,21 |

***Tableau 2 : Différentes valeurs caractéristiques des spectres de la Figure 28 pour un TE = 20 ms.***

Les valeurs des % SD (ou CRLB) mesurées pour le lactate avec l'antenne de 7 mm ou 10 mm pour les spectres de 32 scans sont supérieures à 15 %. On observe une nette amélioration de la quantification du lactate à partir des spectres de 64 scans. Il y a aussi une amélioration de détection de la créatine et phosphocréatine.

### 5.4. Comparaison des différents paramètres séquence LASER

L'antenne de 10 mm de diamètre ayant été choisie, les paramètres de la séquence LASER ont été optimisés. La valeur de TE a été optimisée en premier puis la puissance de l'impulsion RF a été déterminée.

La ***Figure 29*** présente 6 spectres caractéristiques. Des spectres cumulés de 128 scans ont permis d'obtenir le meilleur RSB (16) et ont été utilisés pour l'optimisation du TE. Un TE long de 144 ms, qui permet l'inversion du pic du lactate, est généralement utilisé pour différencier les lipides du lactate dans des conditions de forte concentration (tumeur, par exemple), mais ici le signal du lactate a tout simplement été supprimé par le renversement de son pic. Un TE court a donc été recherché. Un TE de 28 ms a permis d'obtenir un bon RSB (16). Cependant, un TE de 19,26 ms (minimum possible en utilisant le matériel d'acquisition) améliorait encore le RSB (16) mais aussi la sensibilité (% SD = 8). Les valeurs des différents paramètres optimisés figurent dans le ***Tableau 3.***

| Numero du spectre | Averages | TE (ms) | TR (ms) | Conc. | %SD | /Cr+PCr | S/B |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Spectre 1 | 32 | 28 | 2500 | 5,66E-02 | 33 | 0,131 | 9 |
| Spectre 2 | 64 | 28 | 2500 | 9,74E-02 | 14 | 0,199 | 12 |
| Spectre 3 | 128 | 28 | 2500 | 8,58E-02 | 12 | 0,191 | 16 |
| Spectre 4 | 128 | 144 | 2500 | 0,00E+00 | 999 | 0 | 10 |
| Spectre 5 | 128 | 28 | 2500 | 8,73E-02 | 12 | 0,197 | 16 |
| Spectre 6 | 128 | 19,26 | 2500 | 0,129 | 8 | 0,254 | 16 |

***Tableau 3 : Paramètres des spectres de la Figure 29.***

Le ***Tableau 4*** présente les résultats obtenus des tests de différentes puissances d'impulsion RF et différentes valeurs de volume de région d'intérêt. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour un spectre de 128 scans, un volume d'intérêt de 15 $mm^3$ et une puissance d'impulsion RF de 194 W (RSB = 9-10 ; CRLB = 15-18 %).

| Averages | TE (ms) | TR (ms) | Conc. | CRLB | /Cr+PCr | S/B | Puissance de l'impulsion RF | VOI ($mm^3$) | FWHM (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 32 scans | 19,26 | 2500 | 0,156 | 33% | 0,157 | 6 | 174 W | 15 | 0,016 |
| 32 scans | 19,26 | 2500 | 0,121 | 23% | 0,158 | 7 | 184 W | 15 | 0,015 |
| 32 scans | 19,26 | 2500 | 0,114 | 25% | 0,146 | 7 | 194 W | 15 | 0,015 |
| 32 scans | 19,26 | 2500 | 4,06E-02 | 69% | 5,40E-02 | 7 | 204 W | 15 | 0,016 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 4,34E-02 | 48% | 7,80E-02 | 8 | 184 W | 15 | 0,016 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 0,112 | 18% | 0,139 | 10 | 194 W | 15 | 0,016 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 0,107 | 19% | 0,136 | 10 | 204 W | 15 | 0,018 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 9,57E-02 | 21% | 0,119 | 10 | 214 W | 15 | 0,018 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 0,00E+00 | 999% | 0 | 4 | 194 W | 10 | 0,037 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 2,81E-02 | 111% | 6,80E-02 | 4 | 194 W | 10 | 0,029 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 0,134 | 15% | 0,18 | 9 | 194 W | 15 | 0,018 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 0,112 | 18% | 0,139 | 10 | 194 W | 15 | 0,016 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 7,13E-02 | 36% | 0,15 | 4 | 194 W | 18 | 0,021 |
| 64 scans | 19,26 | 2500 | 7,69E-02 | 23% | 0,153 | 8 | 194 W | 18 | 0,023 |

***Tableau 4 : Paramètres de séquences LASER et optimisation du volume d'intérêt ainsi que de la puissance de l'impulsion RF.***

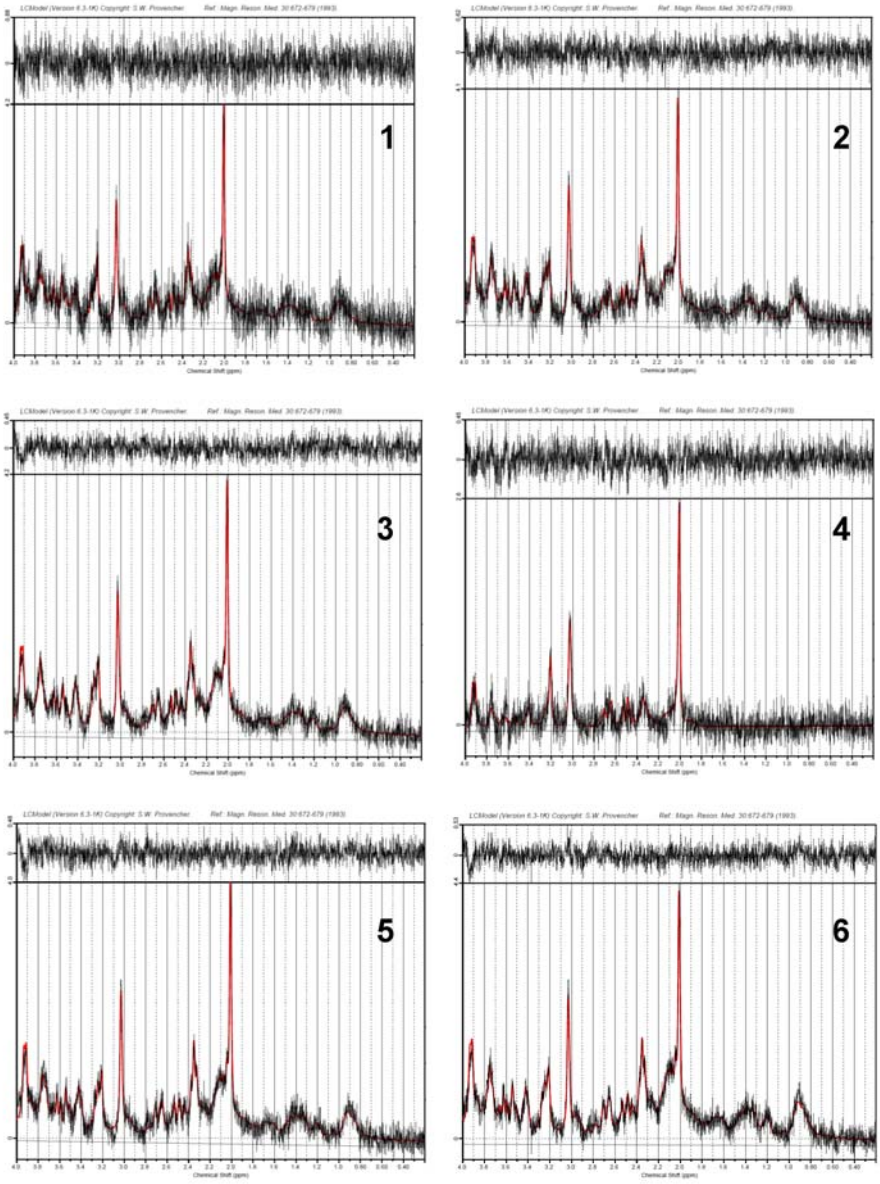



***Figure 29 : Spectres acquis avec l'antenne de surface 10 mm et la séquence LASER. Les spectres 1, 2 et 3 sont respectivement des spectres de 32, 64 et 128 scans avec un TE de 28 ms. Les spectres 4, 5 et 6 sont respectivement des spectres de 128 scans avec une valeur de TE de 144 ms, 28 ms et 19,26 ms.***

## 5.5. Etude cinétique du lactate sous isoflurane

L'isoflurane est un anesthésiant, administré par inhalation, qui peut provoquer une augmentation de la concentration de lactate d'un facteur 3 à 7, suivant les études (mesures par RMN ou microdialyse). Dans notre protocole, le rat est installé dans l'aimant sans isoflurane puis l'anesthésique est remplacé par la médétomidine. Nous avons donc voulu connaitre la cinétique de l'impact de l'isoflurane sur la concentration de lactate pour s'assurer qu'au moment des acquisitions SRM $^1$H son effet avait disparu et que les augmentations de lactate mesurées n'étaient dues qu'à l'activation. Une étude approfondie des effets d'une anesthésie sous isoflurane sur les concentrations cérébrales en lactate au cours du temps a donc été effectuée. Le rat a été anesthésié sous isoflurane (2,5 % ; débit d'$O_2$ = 1,5 L/min) durant les 400 premières secondes de l'acquisition (***Figure 30***), puis l'isoflurane a été coupé. L'espace entre chaque point correspond à la durée d'une séquence LASER de 32 scans soit 1 min 20 s. Une décroissance de la concentration de lactate a été mesurée dans le monovoxel positionné au centre du barrel cortex. Lors de cette première expérience, le temps de retour à la concentration basale de lactate a été estimé à 6 min. Dans le second graphique, l'espace entre chaque point correspond à la durée d'une séquence LASER de 64 scans soit 2 min 40 s. Le temps de retour à la concentration basale du lactate a été estimé à 10 min.
Le positionnement du rat dans l'aimant, sa localisation, le positionnement du monovoxel dans le barrel cortex, l'accord de l'antenne et les réglages de shim sont des étapes qui nécessitaient environ 15 min. Pour un rat, la durée des réglages entre l'arrêt de l'isoflurane (début d'injection de médétomidine) et la première séquence LASER du protocole restait supérieure au temps de décroissance de la concentration de lactate dans le barrel cortex au niveau basal. L'étude était nécessaire et a validé le non-effet de l'isoflurane sur les données de spectroscopie.

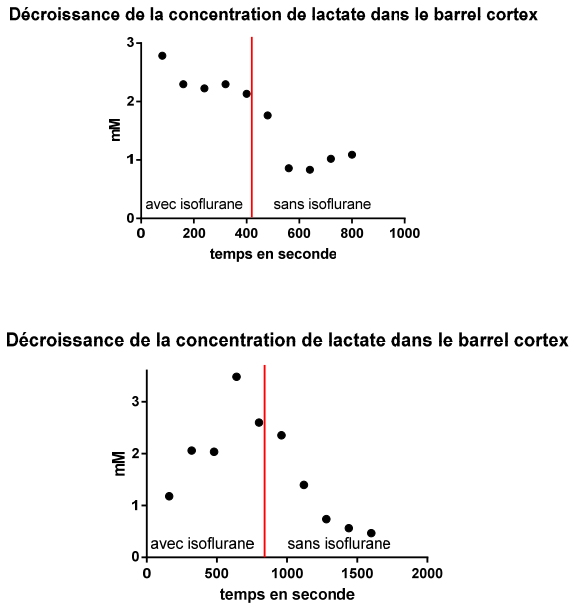



***Figure 30 : Suivis de la concentration de lactate enregistrée au cours de l'anesthésie du rat sous isoflurane. Chaque graphe correspond à un rat différent.***

# Chapitre 3. Etude *in vivo* sur les rats MCTs

## 1. Modèles de rats modifiés génétiquement

Les MCTs jouent un rôle primordial dans la navette lactate. Une approche par injection de vecteurs viraux a été utilisée pour moduler leur expression. Toutes les expérimentations ont été réalisées sur 5 groupes de rats:
- **MCT2** : injection dans les deux S1BF d'adénovirus associés (AAVs) contenant une séquence permettant la répression du transporteur au lactate neuronal MCT2 (shMCT2 (short hairpin ARN), ARN complémentaire de l'ARNm MCT2).
- **UNIV2** : injection dans les deux S1BF du même AAV que pour MCT2 mais contenant à la place du shMCT2 une séquence qui ne va cibler aucun ARNm.
- **MCT4** : injection dans les deux S1BF d'AAVs contenant une séquence (shMCT4) permettant la répression du transporteur au lactate astrocytaire MCT4.
- **MCT1-4** : injection dans les deux S1BF de deux AAVs, un contenant le shMCT4 et l'autre contenant une séquence shMCT1 permettant la répression du transporteur au lactate astrocytaire MCT1.
- **UNIV4**: injection dans les deux S1BF du même AAV que pour MCT4 et MCT1 mais contenant à la place du shMCT4 une séquence qui ne va cibler aucun ARNm.

Tous ces rats ont été fournis par Charlotte Jollé qui termine actuellement son doctorat à l'Université de Lausanne, au Département de Physiologie, sous la direction du Professeur Luc Pellerin. Dans la ***Figure 32***, sont détaillés la localisation des injections *via* l'atlas (région S1BF droit et S1BF gauche) ainsi que la quantité de vecteur viral administrée ($1.10^8$), le débit d'injection (0,2 µl/min) et le volume d'injection total (4 µl) permettant de réprimer l'expression des MCTs. Nos expériences *in vivo* ont été réalisées deux semaines après l'injection des AAVs, durant 2 semaines (2 sessions d'IRMf et de SRM ont été réalisées par rat) puis les rats ont été utilisés pour des études *ex vivo* décrites dans le prochain chapitre.

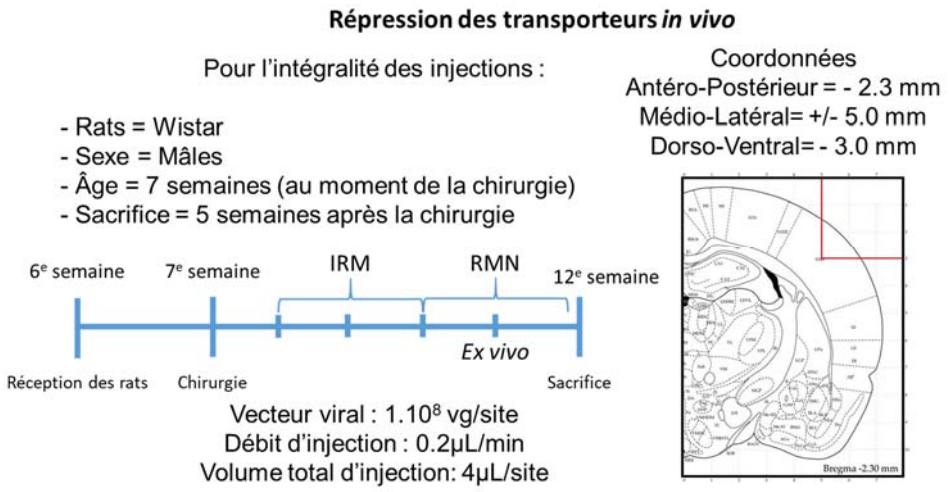



***Figure 32 : Détails du mode opératoire pour la répression des transporteurs in vivo.***

Pour cette approche de répression de gêne par injection d'AAVs, la construction suivante a été utilisée : un vecteur viral contenant un promoteur, un gène rapporteur fluorescent, un micro ARN et une séquence d'intérêt shRNA (***Figure 33***).

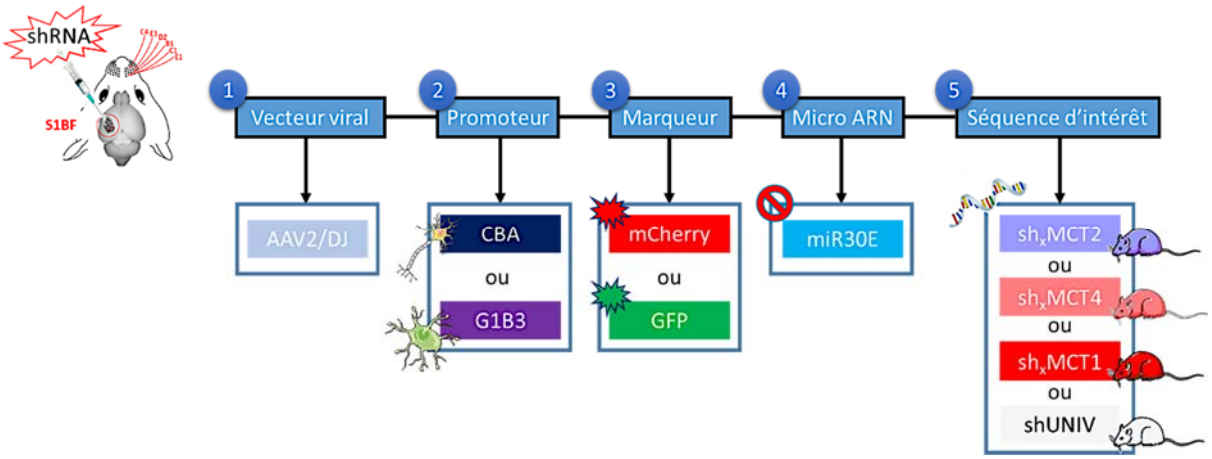



***Figure 33 : Schéma général des différentes constructions utilisées pour la répression de MCTs.***

Le vecteur viral était constitué de la séquence de l'AAV2/DJ (il existe plusieurs versions d'AAV) qui possède la meilleure efficacité de transfection sur neurones et astrocytes. Deux promoteurs ont été utilisés, l'un pour faire exprimer le vecteur dans le neurone (promoteur CBA - chicken beta actin) et le promoteur G1B3 (un dérivé du promoteur de la GFAP une protéine astrocytaire) a été utilisé pour cibler les astrocytes. Pour valider l'efficacité de transfection, deux gènes rapporteurs ont été utilisés : la GFP (Green Fluorescent Protein – détection : fluorophore vert) pour marquer les neurones ou mCherry (détection : fluorophore rouge) pour marquer les astrocytes. La validation de l'expression de ces AAVs a été suivie grâce à ces gènes rapporteurs dans un premier temps (***Figures 34 et 35***). Le micro ARN miR30E a été utilisé afin de moduler le niveau d'expression de la séquence shRNA afin qu'il ne soit pas surexprimé et éviter ainsi toute toxicité pour la cellule. Enfin, différentes séquences d'ARN ont

été utilisées : shMCT2, shMCT4 et shMCT1, qui vont venir s'appareiller sur les ARNm de MCT2, MCT4 et MCT1, respectivement, ce qui va empêcher la traduction et donc la production de la protéine correspondante. Les rats contrôles de cette étude sont des rats qui ont été injectés avec des AAVs contentant la même construction sauf pour la séquence shRNA, qui était non-codante. Deux groupes de rats contrôles ont été analysés car les constructions des AAVs MCT2 et MCT4 étaient différentes. On a donc deux groupes contrôles: un premier appelé UNIV2, contenant la séquence avec le promoteur CBA qui cible les neurones et une séquence shRNA non-codante, et un second groupe, nommé arbitrairement UNIV4, contenant la séquence avec le promoteur G1B3 qui cible les astrocytes et une séquence shRNA non-codante.

Charlotte Jollé a développé, avec Luc Pellerin et Nicole Déglon, tous les AAVs nécessaires pour obtenir les animaux modifiés génétiquement (MCT2, MCT4 et MCT1-4). La répression de MCT2, MCT4 et MCT1-4 a d'abord été validées *in vitro* sur des cultures de neurones et d'astrocytes, par RT-qPCR (quantification des ARNm) et Western Blot (quantification des protéines).

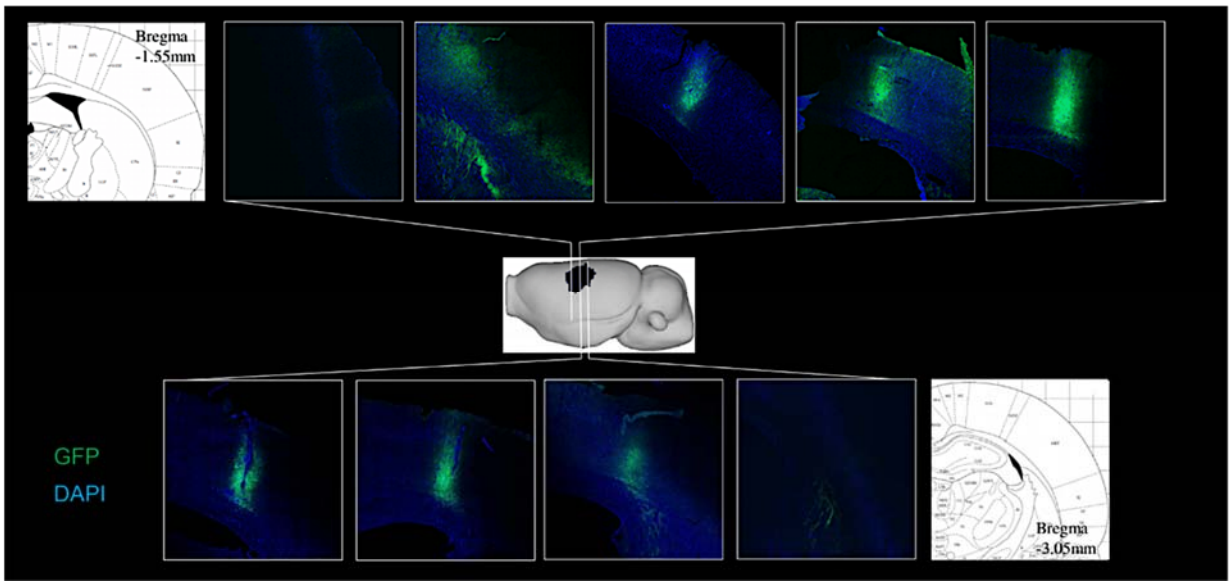



***Figure 34 : Visualisation du GFP et DAPI (marquage des noyaux en bleu) pour valider l'expression de l'AAV contenant le shMCT2.***

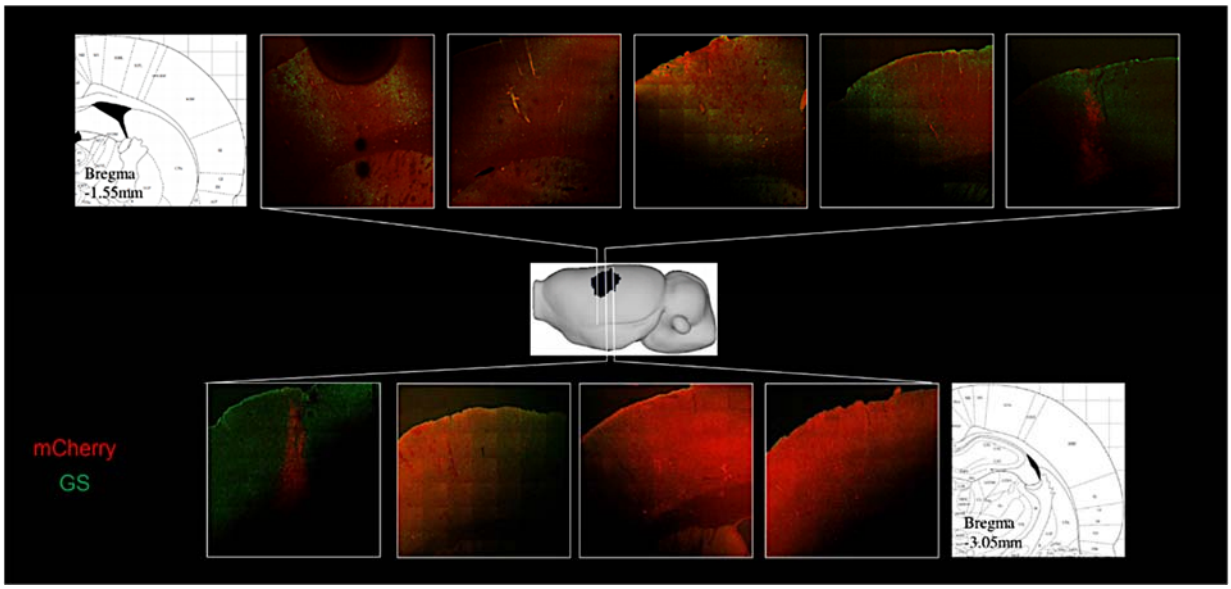



***Figure 35 : Visualisation du mCHerry et de la glutamine synthétase (GS, marquage vert), enzyme spécifiquement astrocytaire) pour valider l'expression de l'AAV contenant le shMCT4.***

Les répressions de MCT2 et de MCT4 ont été également validées *in vivo* sur des extraits cérébraux (RT-qPCR, Western Blot et fluoro-histochimie). La répression de MCT1-4 n'a quant à elle pas encore mesurée *in vivo*. Sans rentrer dans les détails, on notera les bons résultats obtenus, avec des taux de répression des protéines visées très élevées : des diminutions de 21 % et 63 % des ARNm codant pour MCT2 et MCT4 et des chutes de 54 % et 54 % des protéines MCT2 et MCT4, respectivement, ont été mesurées.

## 2. Résultats d'IRMf pour les rats UNIV, MCT2, MCT4 et MCT1-4

Dans cette étude, l'objectif général était de valider, sur les rats modifiés génétiquement, l'activation cérébrale du S1BF lorsque les vibrisses étaient stimulées dans l'IRM *via* les données d'IRMf BOLD. L'étape de vérification de l'efficacité de la stimulation des vibrisses sur des rats contrôles a été détaillée en amont et a permis l'utilisation du protocole sur les rats génétiquement modifiés. L'étude a été menée sur les rats UNIV2 (n = 14), MCT2 (n = 9), UNIV4 (n = 8), MCT4 (n = 11) et MCT1-4 (n = 4). La ***Figure 36*** présente des images représentatives des résultats BOLD obtenus pour chaque groupe.

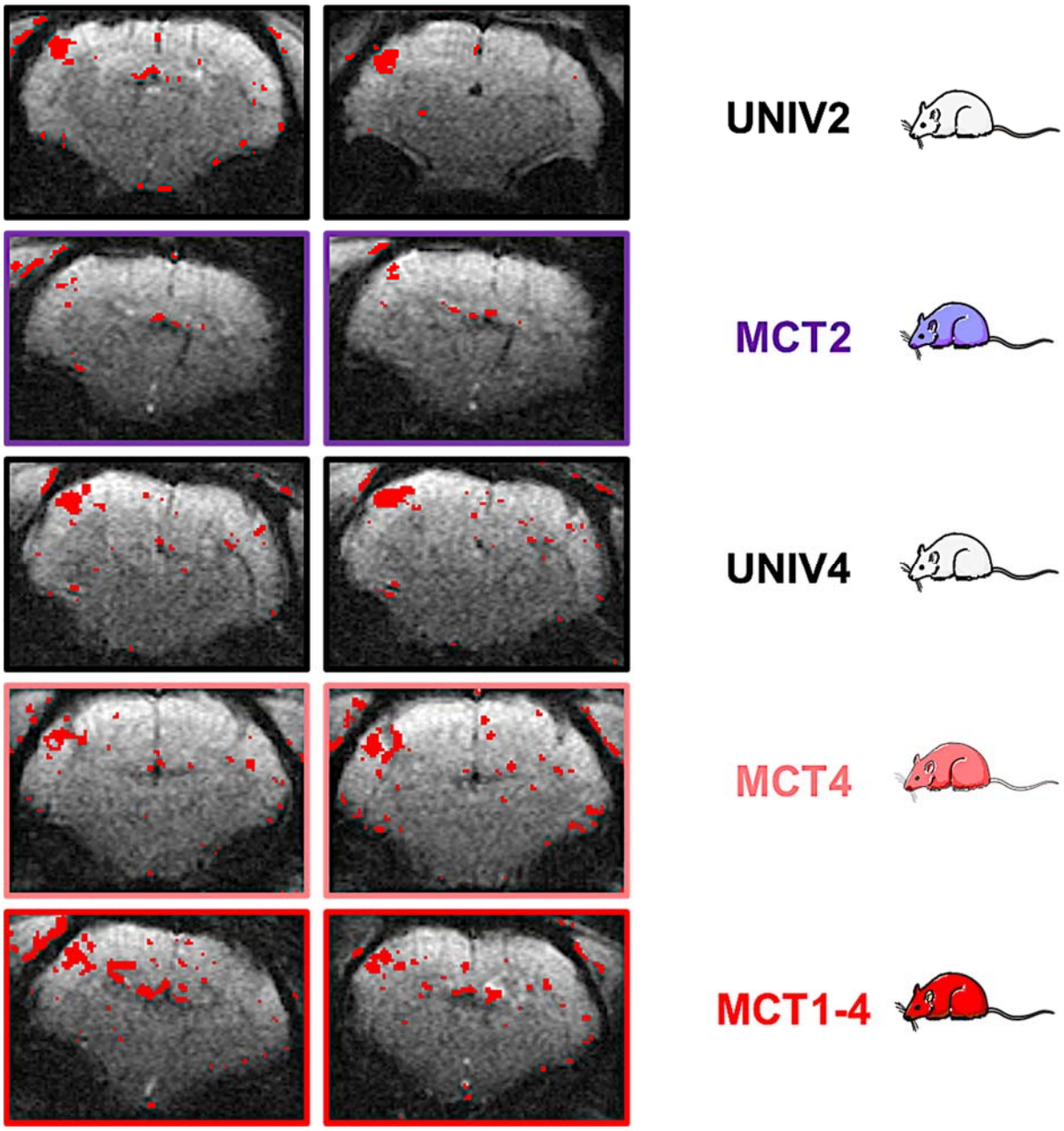



***Figure 36 : Images typiques des résultats IRMf BOLD obtenus pour deux rats différents pour chacun des groupes UNIV2, MCT2, UNIV4, MCT4 et MCT1-4 lors de l'activation des vibrisses droites des animaux.***

Un seuil de 80 % de la valeur d'intensité maximale de chaque coupe issue des données BOLD a été fixé. Les camemberts ***Figure 37A*** indiquent le nombre de BOLD positives et négatives (1 à 4 IRMf ont été enregistrées par animal). Pour les IRMf avec un signal positif, le nombre de pixels dépassant le seuil a été quantifié dans chaque hémisphère (***Figure 37B***). Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée, suivie d'un test post-hoc (Fisher LSD).

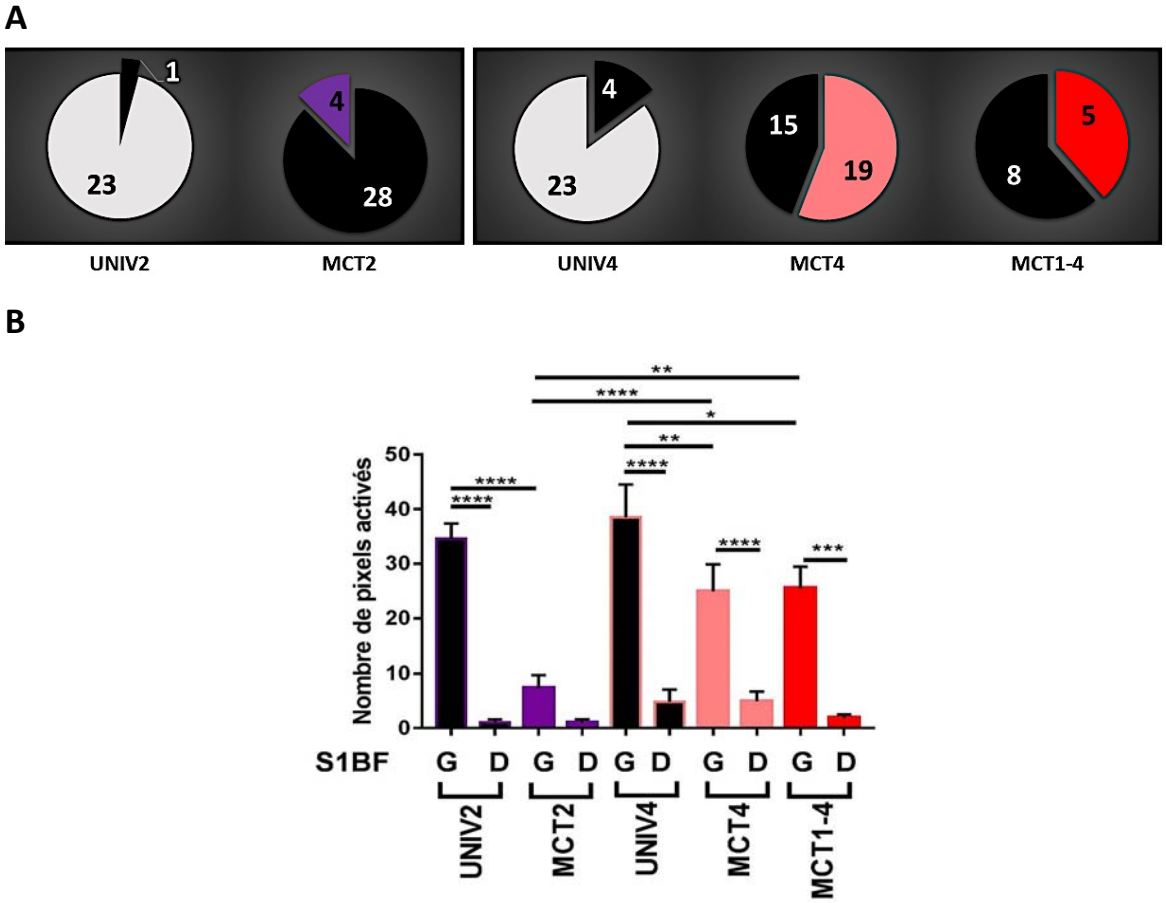



***Figure 37 : (A) Représentation du nombre d'IRMf ayant un signal BOLD positif (blanc ou couleur) versus celles qui étaient négatives (en noir). UNIV2 (n=14), MCT2 (n=9), UNIV4 (n=8), MCT4 (n=11) et MCT1-4 (n=4). (B) Quantification du nombre de pixels dépassant la valeur seuil fixée pour les groupes UNIV2, MCT2, UNIV4, MCT4, MCT1-4, dans le S1BF gauche (G - activé) et droit (D - non activé). Un test ANOVA a été effectué, suivi d'un Fisher LSD. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.***

Pour les rats UNIV2 et UNIV4 96 % et 85 % des IRMf étaient positives, respectivement. Le nombre de pixels activés était significativement plus élevé dans le barrel cortex gauche par rapport au droit. De plus, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le nombre de pixels activés dans le S1BF gauche des rats UNIV2 et ceux des rats UNIV4. Ce résultat indique que pour les rats UNIV, la stimulation des vibrisses droites a entraîné, uniquement dans le S1BF controlatéral, une augmentation du signal BOLD, reflet de l'activation cérébrale. Il faut noter que dans le groupe UNIV4, les 4 BOLD négatives proviennent toutes du même animal, ce qui laisse à penser qu'il y aurait eu un souci lors de la chirurgie et l'injection des AAVs pour cet animal. Pour le groupe MCT2 on obtient 88 % d'IRMf négatives. Il n'y a pas de différence significative du nombre de pixels entre les S1BF droit et gauche durant la stimulation des vibrisses. La répression du MCT2 a inhibé l'effet BOLD, reflétant une absence d'activation cérébrale. Notons que pour les 4 BOLD positives de ce groupe (quantification dans la ***Figure 37B***) le niveau d'activation est très bas et bien inférieur à celui mesuré pour les rats UNIV. Les groupes MCT4 et MCT1-4 ont 56 % et 38 % d'IRMf positives respectivement, avec une augmentation du nombre de pixels dépassant le seuil significativement plus élevé dans le S1BF droit, comparé au S1BF gauche. Cependant, le nombre de pixels activés était significativement plus faible pour ces deux groupes, comparé au groupe contrôle UNIV4.

Si la répression des MCT4 ou des MCT1-4 n'a pas totalement inhibé le signal de l'activation cérébrale, elle l'a néanmoins diminué. Ce résultat peut s'expliquer d'une part par la redondance fonctionnelle des MCT1 et des MCT4 astrocytaires (pour le groupe MCT4) et d'autre part par le fait que l'inhibition du transfert du lactate astrocytaire vers les neurones (*via* la répression MCT1 et MCT4) n'empêche pas les neurones de s'approvisionner en substrats énergétiques de manière autonome (lactate compris puisque le transporteur MCT2 n'est pas touché et que le lactate est présent dans le compartiment extracellulaire à une concentration de l'ordre du mM), permettant une activation cérébrale.

## 3. Résultats de SRM fonctionnelle *in vivo*

### 3.1. Lactate

La spectroscopie RMN $^{1}$H localisée *in vivo* a été réalisée dans la zone S1BF (taille du voxel 2 x 2,5 x 3 mm) des rats UNIV (les résultats pour UNIV2 et UNIV4 ont été regroupés car non statistiquement différents), MCT2, MCT4, et MCT1-4. Lors de l'activation cérébrale, une augmentation du lactate a été mesurée uniquement pour les rats UNIV (quantification par LCModel, ***Figure 38***). Les ratios de lactate (activé / repos) étaient de 1,21 ± 0,05 (n = 22) pour les rats UNIV, de 1,03 ± 0,05 (n = 9) pour les rats MCT2, de 1,04 ± 0,04 (n = 11) pour les rats MCT4 et de 0,89 ± 0,14 (n = 4) pour les rats MCT1-4. La stimulation des vibrisses a induit une augmentation de la concentration en lactate uniquement dans le S1BF activé pour les rats du groupe UNIV. Des spectres caractéristiques sont présentés ***Figure 39***. Une soustraction des spectres activés par les spectres au repos permet de visualiser qualitativement les différences des contenus en métabolites entre une situation au repos et un état activé. Sur le spectre de soustraction un pic apparaît à 1,32 ppm (déplacement chimique des protons du groupement méthyl du lactate) pour les rats UNIV qui n'a pas pu être observée pour les rats MCTs. De légères fluctuations du NAA à 2,01 ppm ont été observées sur la différence des spectres activé/repos (exemple : rat UNIV et MCT4).

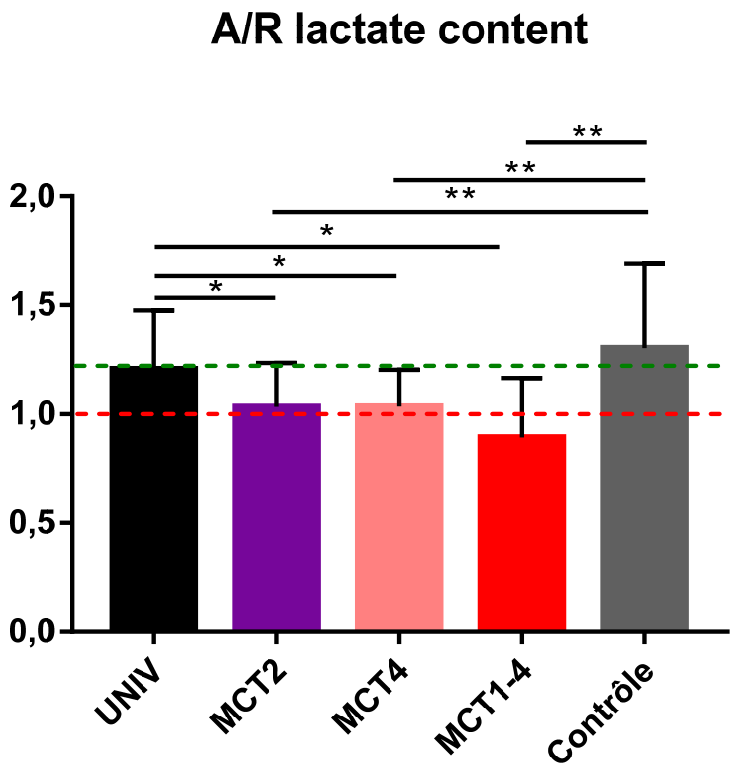



***Figure 38 : Rapports des concentrations de lactate quantifiées par LCModel (valeur dans la zone S1BF du cortex somatosensoriel activée sur la valeur mesurée dans la zone S1BF du cortex somatosensoriel au repos) pour les rats UNIV, MCT2, MCT4, MCT1-4 et contrôles. Un test ANOVA a été effectué, suivi d'un Fisher LSD. * p < 0,05; ** p < 0,01. Le trait en pointillé rouge indique la valeur pour laquelle aucune différence n'est mesurée entre un S1BF au repos et activé, celui en vert permet de comparer les groupes UNIV et contrôle.***

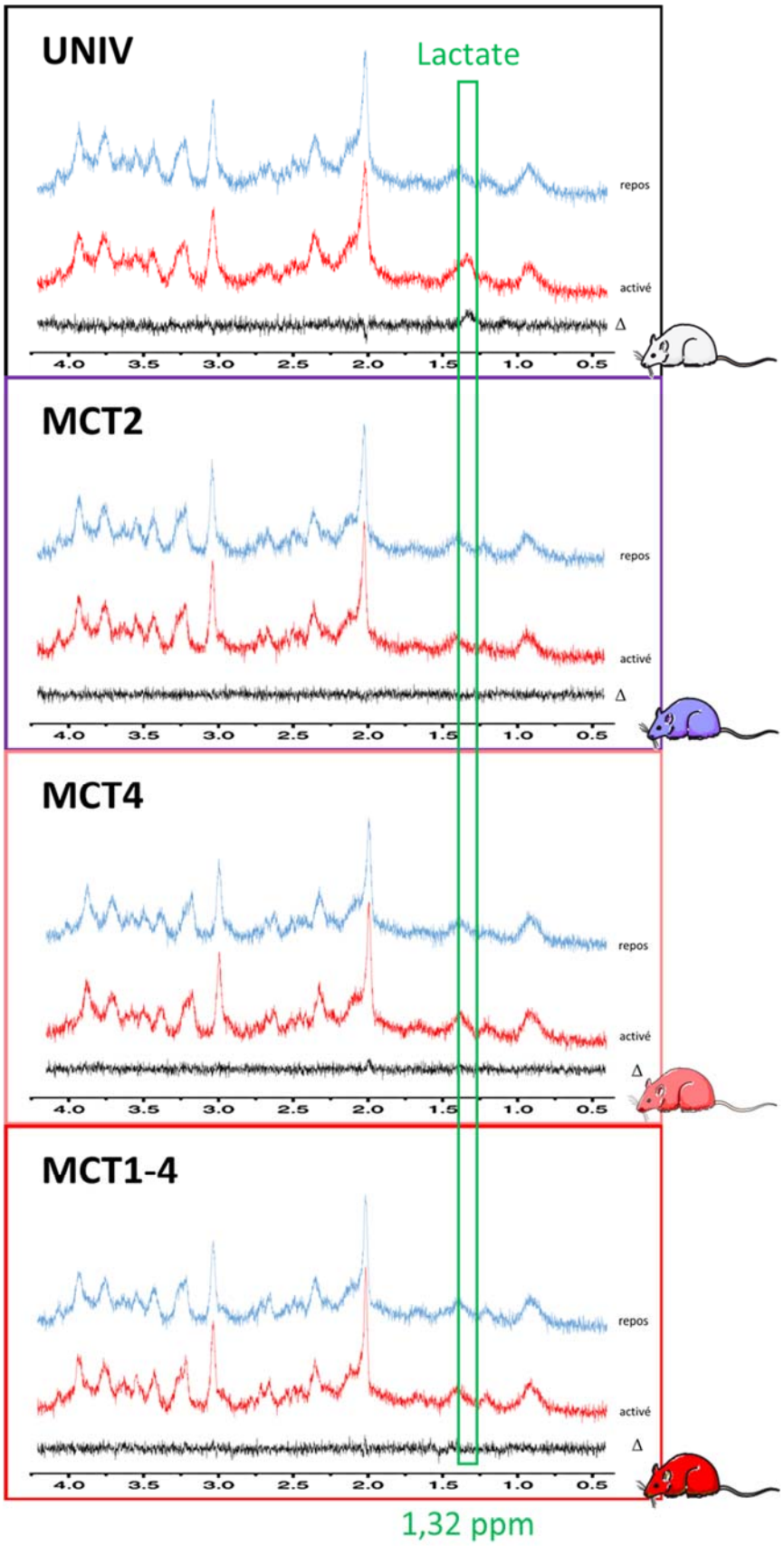



***Figure 39 : Spectres caractéristiques (128 scans, antenne de surface 10 mm, séquence LASER) durant l'activation cérébrale (rouge) et au repos (bleu) pour les rats UNIV, MCT2, MCT4 et MCT1-4. Les spectres noirs sont des soustractions des spectres activés et repos.***

### 3.2. N-acétyl-aspartate et N-acétyl-aspartyl-glutamate

Une quantification par LCModel des concentrations de N-acétyl-aspartate (NAA) et N-acétyl-aspartyl-glutamate (NAAG) a été réalisée à partir des données de spectroscopie RMN $^{1}$H *in vivo* (***Figure 40***, quantification relative à la quantité de créatine totale - tCr - créatine + phosphocréatine). Quel que soit le groupe considéré, aucune différence significative n'a été mesurée entre les concentrations de NAA ou NAAG des S1BF au repos et celles des S1BF activés. De plus, aucune différence significative n'a été mesurée entre les rats UNIV2 et MCT2, ni entre les groupes UNIV4, MCT4 et MCT1-4. La répression des MCTs dans le S1BF n'a nullement impacté le rapport de concentration NAA/tCr et NAAG/tCr. La stimulation des vibrisses n'a pas modulé le rapport des concentrations NAA/tCr et NAAG/tCr.

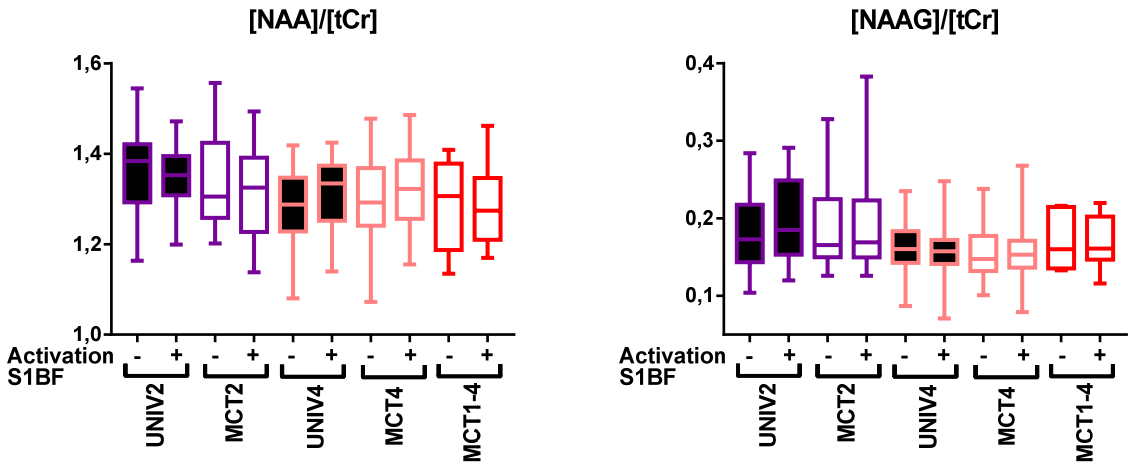



***Figure 40 : Quantifications des concentrations de NAA et NAAG relatives par rapport à la créatine totale (tCr) issues des données de spectroscopie RMN $^{1}$H in vivo.***

La quantification de la concentration de (NAA+NAAG) relatif par rapport à la tCr a mené aux mêmes conclusions que les quantifications individuelles des concentrations de NAA et de NAAG (***Figure 41***). Aucune différence intergroupe n'a été mesurée ; de même qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la concentration (NAA + NAAG) du S1BF activé et du S1BF au repos, quel que soit le groupe considéré. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une fluctuation de ce métabolite lors de l'activation cérébrale comme cela avait été montré [62].

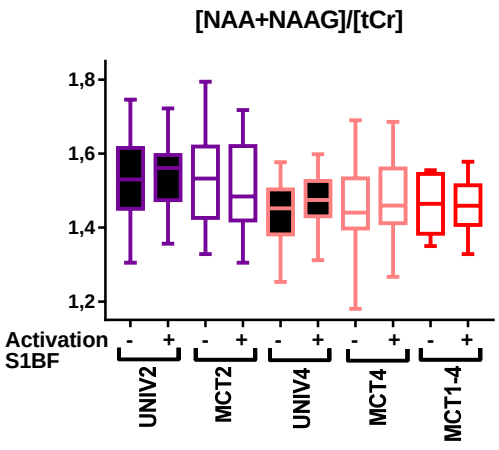



***Figure 41 : Quantification de la concentration (NAA+NAAG) relative par rapport à la créatine totale (tCr) issue des données de spectroscopie RMN $^{1}$H in vivo.***

### 3.3. Glutamine et Glutamate

La quantification des concentrations de glutamine (Gln) (***Figure 42***) et de glutamate (Glu) (***Figure 43***) a été réalisée *in vivo,* à partir des données de spectroscopie RMN $^{1}$H et l'analyse LCModel. Quel que soit le groupe considéré, aucune différence significative n'a été mesurée entre les concentrations de Gln ou Glu des S1BF au repos et celles des S1BF activés. De plus, aucune différence significative n'a été mesurée entre les rats UNIV2 et MCT2, ni entre le groupe MCT4 et les groupes MCT4 et MCT1-4. La stimulation des vibrisses induisant (ou non, pour MCT2) une activation cérébrale n'a pas impacté la concentration de Gln ni de Glu. Par contre, les concentrations en Glu des S1BF activés ou au repos du groupe UNIV4 étaient significativement plus faibles que celles du groupe UNIV2, suggérant un impact à ce niveau de l'injection de l'AAV UNIV4. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une l'augmentation de glutamate lors de l'activation comme cela avait pu être montré chez l'homme [63].

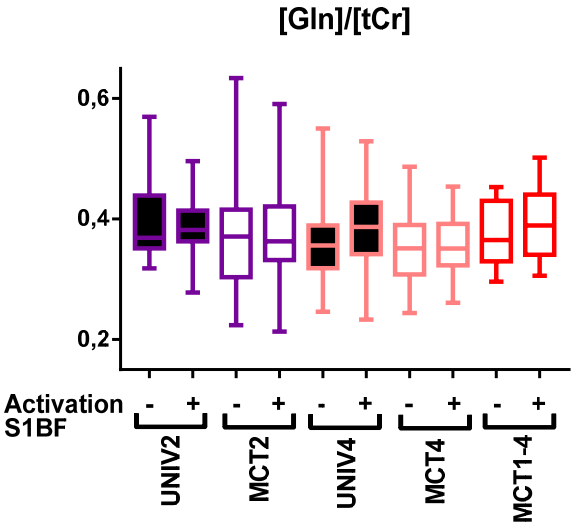



***Figure 42 : Quantifications des concentrations de Gln relatives par rapport à la créatine totale (tCr) issues des données de spectroscopie RMN $^{1}$H in vivo.***

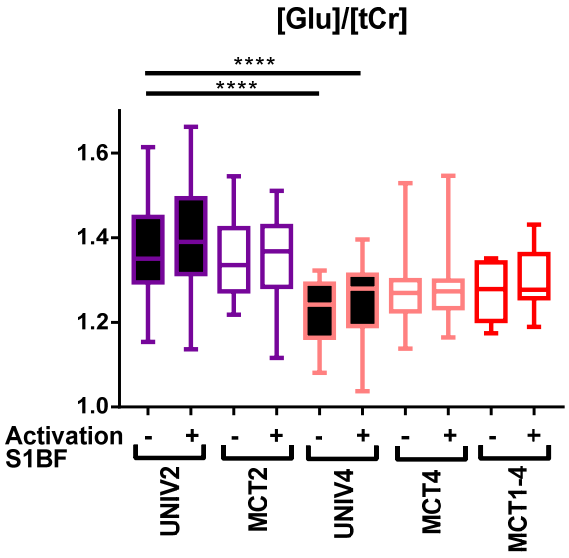



***Figure 43 : Quantifications des concentrations de Glu relatives par rapport à la créatine totale (tCr) issues des données de spectroscopie RMN $^{1}H$ in vivo.***

## 4. Expérience de « rescue »

L'objectif de cette expérience était de tester si l'injection de lactate dans la circulation sanguine pourrait modifier (rétablir?) les signaux BOLD qui étaient soit perdus, soit atténués, dans les groupes MCT2, 4 et 1-4.

Dans un premier temps, avant d'effectuer les mesures d'IRMf BOLD, une étude de suivi des fluctuations de concentration de lactate a été réalisée sur deux rats contrôles sous perfusion de lactate (***Figure 44***). Le rat a été placé dans l'aimant et la concentration de lactate a été mesurée par spectroscopie *in vivo* localisée, toutes les 5 minutes. La perfusion de lactate a été lancée après la première mesure et sur une durée de 20 min (solution de lactate à 534 mM, protocole de perfusion identique à celui utilisé pour les analyses *ex vivo*, voir chapitre suivant). Le maximum de concentration de lactate dans le barrel cortex a été enregistré entre le point 4 (10 min après le début de la perfusion) et le point 5 (15 min après le début de la perfusion) pour les deux rats contrôles. Ces résultats ont permis de fixer le délai d'attente entre le début de la perfusion lactate et l'enregistrement de l'IRMf : 10 min après le début de la perfusion de lactate.

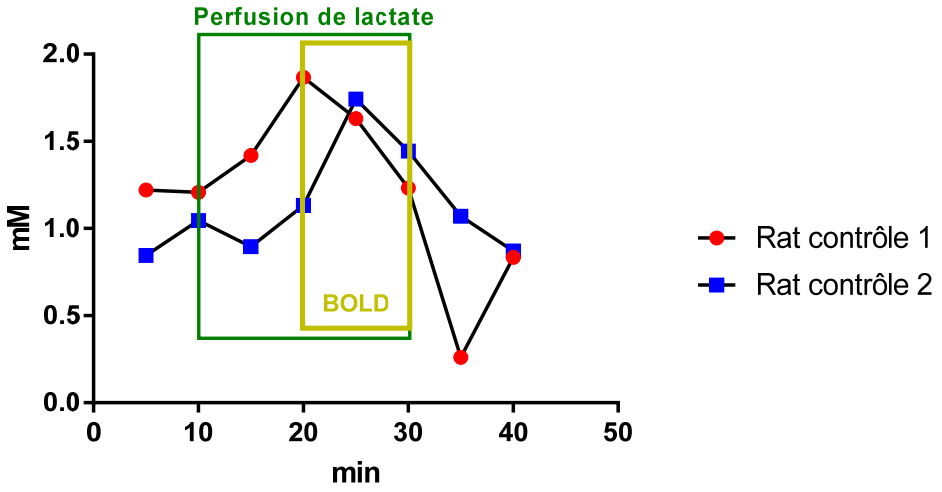



***Figure 44 : Suivi cinétique de la concentration de lactate dans le barrel cortex pour deux rats contrôles sous perfusion de lactate.***

La ***Figure 45*** présente les résultats de la quantification de l'activité cérébrale par IRMf BOLD avant et après perfusion de lactate. Les moyennes des intensités des pixels enregistrés par ROI y sont représentées pour les rats UNIV (n = 2), MCT2 (n = 4), MCT4 (n = 5) et MCT1-4 (n = 4). Pour le S1BF activé (ROI1, ***Figure 45 A***) des rats MCT4 et MCT1-4, une augmentation de la moyenne de l'intensité des pixels avant et après perfusion peut être observée mais elle n'est statistiquement significative que pour le groupe MCT1-4. La moyenne de l'intensité des pixels du S1BF controlatéral (ROI2, ***Figure 45 B***) et du bruit (ROI3, ***Figure 45 C***) a tendance à augmenter chez les rats UNIV, MCT4 et MCT1-4 avant et après perfusion mais cette variation n'est pas statistiquement significative.

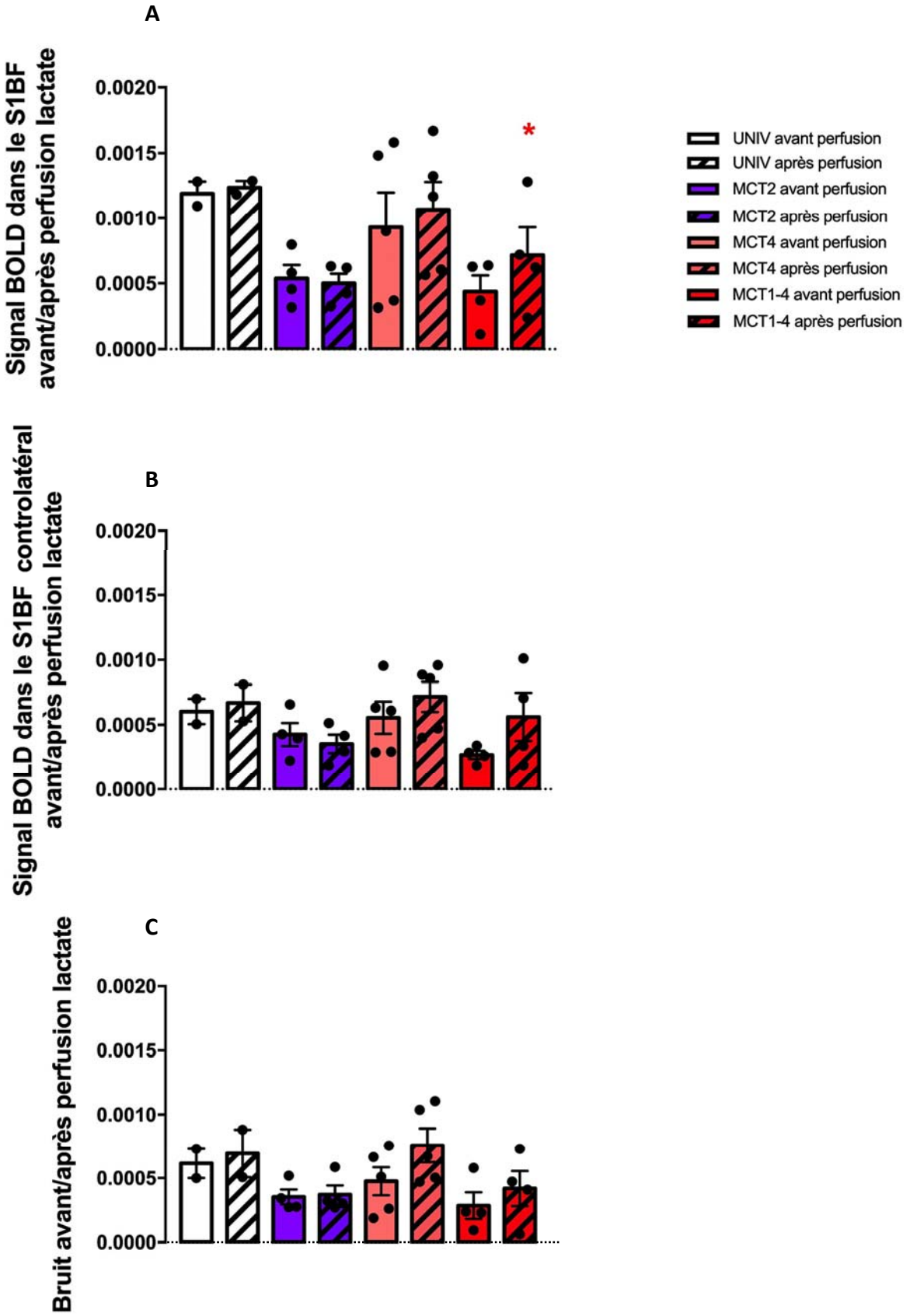



***Figure 45 : Résultats de la quantification de l'activité cérébrale par IRMf BOLD. Moyennes d'intensités mesurées dans 3 ROI : (A) ROI 1 placé dans le S1BF activé, (B) ROI2 : placé dans le S1BF controlatéral et (C) ROI3 : placé dans une zone corticale non activée pour mesurer le bruit. Les mesures ont été réalisées pour les rats UNIV, MCT2, MCT4 et MCT1-4 avant et après perfusion de lactate. * significativement différent entre avant et après perfusion, p = 0,037, ratio paired t-test.***

La ***Figure 46*** présente les résultats de chaque rat individuel de cette manip de "rescue". La ligne jaune représente la moyenne des valeurs de bruit et la zone hachurée en jaune son écart type : elle représente la "non-activation". Cette expérience manque clairement d'un nombre suffisant d'animaux mais reste intéressante car on voit bien que les rats MCT2 qui ont perdus la réponse BOLD sont insensibles à la perfusion de lactate, ce qui semble logique de même que ceux qui ont une réponse positive au BOLD (comme les rats UNIV et les rats 1 et 3 MCT4). Par contre, pour les rats qui sans perfusion de lactate ont une réponse intermédiaire (rat 4 MCT4 et rat 4 MCT1-4, entourés) la perfusion de lactate augmente fortement la réponse BOLD.

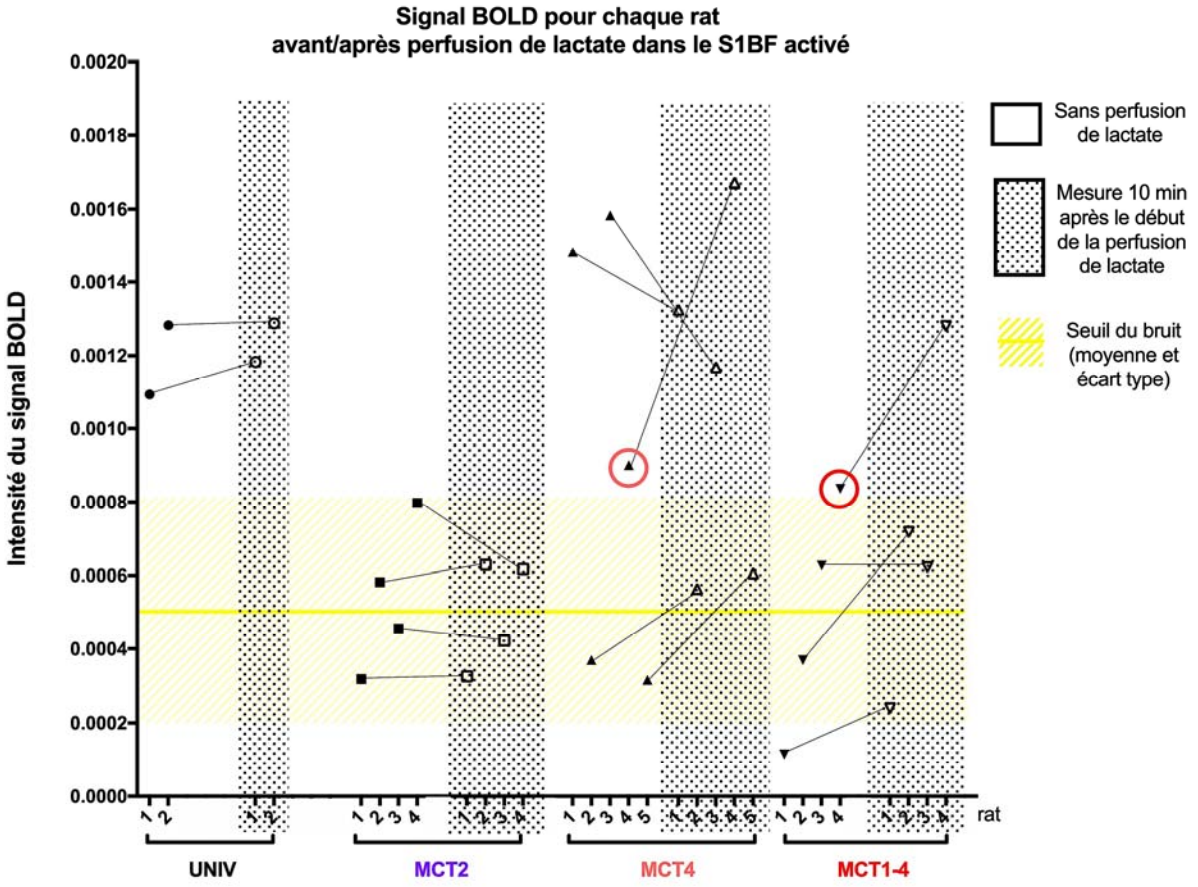



***Figure 46 : Détail des réponses individuelles des rats à l'IRMf avant (zone claire) et après (zone grisée) perfusion de lactate pour chacun des groupes. Zone jaune: zone correspondante au bruit.***

# Chapitre 4. Etude *ex vivo* sur les rats MCTs

A l'issue de l'étude *in vivo*, certains rats modifiés génétiquement ont été perfusés avec une solution de [1-$^{13}$C]glucose (rats UNIV2 n=4, MCT2 n=8, UNIV4 n=7, MCT4 n=12 et MCT1-4 n=4). Cette étude a été réalisée sur des animaux vigiles, entraînés pour rester calme sur un support tout en étant perfusé et en ayant une stimulation des vibrisses droites. L'analyse par spectroscopie RMN du $^{13}$C est une approche technique puissante pour étudier le métabolisme dans le cerveau [64]. Elle a l'inconvénient d'être effectuée *ex vivo* mais ceci lui confère en contrepartie l'avantage d'une bien meilleure résolution que les études *in vivo*. Cette approche est parfaitement complémentaire du travail présenté dans le Chapitre 3.

## 1. Protocole de contention des rats

Cette étude, réalisée sur des rats vigiles, a nécessité au préalable un protocole d'habituation. Un support de contention en plexiglas conçu au laboratoire, du ruban adhésif et une sangle velcro pour améliorer la contention ont été utilisés. Les rats ont été anesthésiés sous isoflurane par inhalation (4 % induction et maintien à 2 % lors du passage du rat de la chambre d'induction à la hotte où la contention s'est déroulée). Une fois anesthésié, le rat a été positionné sur le ventre, sur la surface supérieure du support de contention et maintenu à l'aide de ruban adhésif et du velcro (***Figure 47***). Lorsque le rat est correctement installé, l'isoflurane est coupé. L'entraînement a eu lieu 1 h par jour pendant 3 jours. A la fin de chaque contention, les rats, vigiles, étaient libérés et remis dans leur cage. Dès le second jour les rats restent calmes sur le support et le troisième jour les rats s'endorment dessus. Le quatrième jour, l'expérience de stimulation des vibrisses et de perfusion au [1-$^{13}$C]glucose a été réalisée.

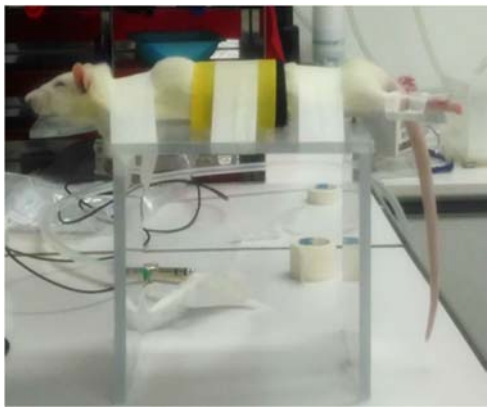


***Figure 47 : Positionnement du rat sur la plateforme de contention.***

## 2. Protocole de stimulation des vibrisses

Après trois jours de conditionnement, les rats éveillés, en contention, ont été perfusés avec une solution de glucose enrichi en $^{13}$C sur la position carbonée 1 ([1-$^{13}$C]glucose, 750 mM, isotope Cambridge, enrichissement à 99 %). La perfusion a été réalisée grâce à un cathéter posé dans la veine caudale. Le débit était contrôlé par un pousse-seringue: durant les 25 premières minutes, le débit de perfusion était programmé afin d'obtenir une vitesse exponentielle décroissante variant de 15 à 1,23 mL/h puis était maintenu constant jusqu'à la fin de l'heure de stimulation à cette dernière vitesse. Durant tout le temps de la perfusion, la stimulation des vibrisses était effectuée en continu, grâce au même système d'air pulsé utilisé précédemment (fréquence : 5 Hz). Après une heure de stimulation, les rats ont été rapidement euthanasiés par micro-ondes focalisées sur le cerveau (5 KW, 1 s, Sacron8000, Sairem). L'irradiation par micro-ondes permet d'euthanasier l'animal en figeant le métabolisme

cérébral, seule façon de s'affranchir des biais induits par le métabolisme *post-mortem* (production de lactate anaérobique) point essentiel dans cette étude.

Après ouverture du scalpe, un trou a été réalisé sur le crâne à l'aide d'une mini foreuse au niveau du point Bregma. Le cerveau a ensuite été rapidement prélevé à l'aide d'une scie circulaire, et une tranche de 3 mm d'épaisseur a été découpée grâce à deux lames de rasoir et une matrice cérébrale de rat permettant de localiser la zone voulue (en s'aidant du point Bregma). Une fois la tranche mise à plat, les zones S1BF (gauches, activées, et droite, non activées) ont été rapidement disséquées, congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C en attendant d'être analysées par RMN HR-MAS. L'objectif est de comparer le métabolisme entre les zones activées (S1BF gauche) et les zones non activées (S1BF droit) pour les différents groupes.

## 3. Protocole d'extraction perchlorique

Les S1BF ont été analysés par spectroscopie RMN HR-MAS (High Resolution at the Magic Angle Spinning). La RMN HR-MAS permet soit d'analyser directement des biopsies tout en ayant un spectre de qualité identique à celui qu'on aurait pu obtenir sur un échantillon liquide, soit d'analyser des liquides de petits volumes (50 µL). Dans notre étude, après avoir testé les deux approches, nous avons opté pour des analyses de liquides. Les biopsies ont donc été préparées sous forme d'extraits à l'acide perchlorique, qui permet d'extraire tous les métabolites hydrosolubles. Les S1BF congelés ont été pesés puis transvasés dans un microtube avec 100 µl d'acide perchlorique 0,9 M. La forme du microtube était adaptée à un homogénéisateur qui a permis de broyer l'intégralité du tissu en présence de l'acide puis une centrifugation 10 min à 10000 rpm a permis de récupérer le surnageant, contenant les métabolites.

Le surnageant a été neutralisé par une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) afin d'obtenir un pH neutre compris entre 6,8 et 7,2. Le précipité de perchlorate de potassium ($KClO_4$) a été éliminé par centrifugation et le surnageant a été lyophilisé. Les extraits finalement obtenus ont été repris dans 55 µL d'oxyde de deutérium ($D_2O$) et 15 µl de fumarate (référence externe). Un peu de résine de chelex (chélatant) a été ajoutée afin d'éliminer le maximum de sels. L'ensemble a été filtré par laine de verre.

## 4. Séquences utilisées

Les spectres de RMN ont été obtenus avec un spectromètre Bruker Ascend 500 équipé d'une sonde HR-MAS (High Resolution at the Magic Angle Spinning).

### 4.1. Spectroscopie RMN $^1$H

Les spectres $^1$H-RMN ont été acquis à 21,85°C avec un angle de bascule de 90° (mesuré pour chaque échantillon), un délai de relaxation de 8 s, une largeur de balayage de 5000 Hz et une taille de mémoire de 32 K. Le signal d'eau résiduelle a été supprimé par la présaturation

homonucléaire. Des spectres types de RMN du proton d'extrait perchlorique de S1BF au repos et activé d'un rat UNIV et d'un rat MCT sont présentés ***Figure 48***.

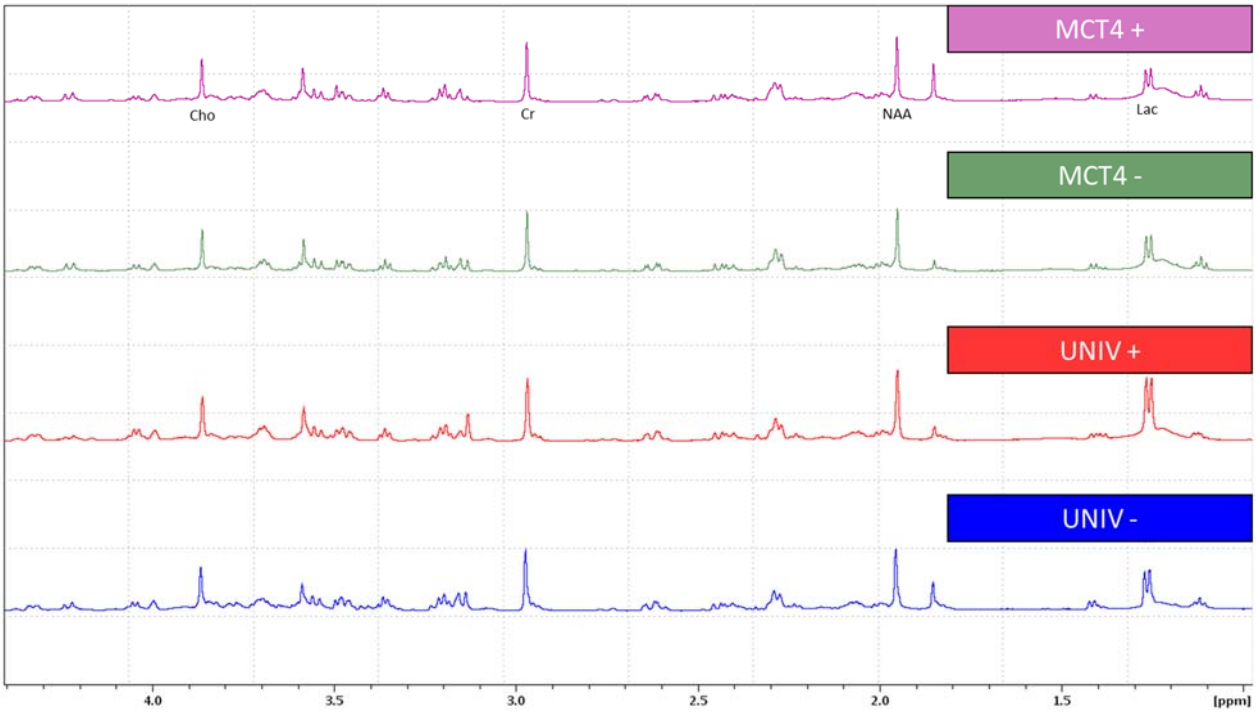



***Figure 48 : Spectres HRMAS $^{1}$H-RMN d'extraits d'acide perchlorique de la zone S1BF au repos (bleu) et activée (rouge) pour un rat UNIV et de la zone S1BF au repos (vert) et activée (violet) pour un rat MCT4. Ces spectres sont représentatifs des différents groupes. Lac, lactate ; NAA, N-acétyl-aspartate ; Cr, créatine ; Cho, choline.***

### 4.2. Spectroscopie RMN $^{13}$C

Les spectres de $^{13}$C-RMN découplés en protons ont été acquis en utilisant un angle de basculement de 60°, un délai de relaxation de 10 s, une largeur de balayage de 2563 Hz et une taille de mémoire de 64 K. Les mesures ont été effectuées à 21,85°C dans des conditions de découplage de protons et de verrouillage $D_2O$ à large bande. À partir de ces spectres, les incorporations en $^{13}$C aux différentes positions carbonées des composés ont été quantifiées. En résumé, les incorporations de $^{13}$C dans les carbones 2, 3 et 4 du glutamate et de la glutamine, du carbone 2 du GABA, des carbones 3 de l'alanine, de l'aspartate et du lactate ont été déterminées à partir de l'intégration des résonances observées par rapport au pic de fumarate (référence externe : métabolite de concentration connue ajouté à l'échantillon). Les spectres sont ensuite normalisés en fonction du poids de la biopsie grâce au pic de fumarate. Cependant, la taille de nos échantillons était trop petite pour avoir des mesures fiables sur l'ensemble des données. Des spectres types de RMN du $^{13}$C d'extrait perchlorique de S1BF au repos et activé d'un rat UNIV et d'un rat MCT sont présentés ***Figure 49***.

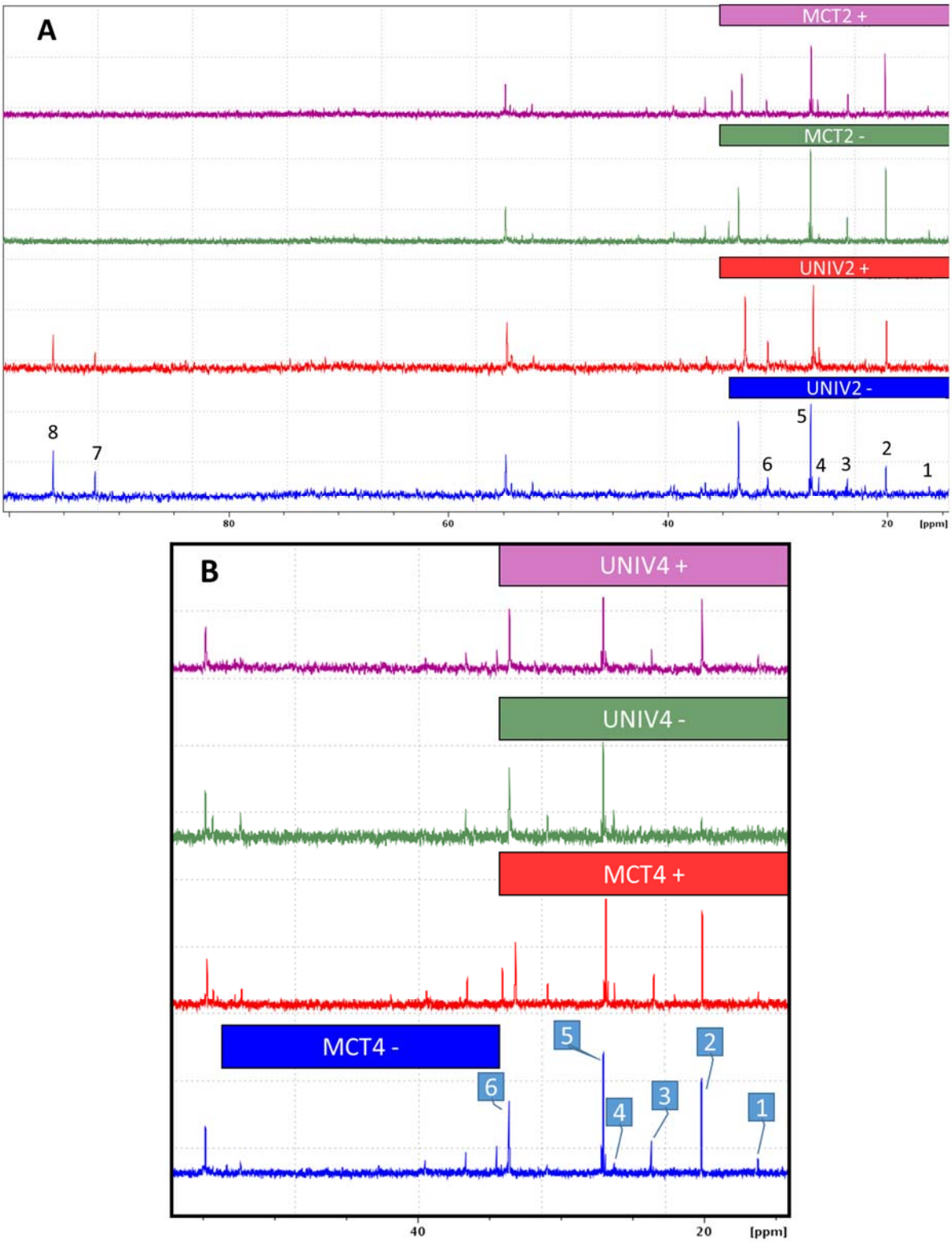



***Figure 49 : (A) Spectres HRMAS proton découplé RMN $^{13}C$ d'extraits d'acide perchlorique de la zone S1BF au repos (bleu) et activée (rouge) pour un rat UNIV et de la zone S1BF au repos (vert) et activée (violet) pour un rat MCT2 après perfusion de [1-$^{13}C$]glucose. Ces spectres sont représentatifs des différents groupes. Les pics des métabolites d'intérêt sont numérotés : 1, Ala C3 ; 2, Lac C3 ; 3, Glu C3 ; 4, Gln C4 ; 5, Glu C4 ; 6, Glu C2 ; 7, Gluc C1α ; 8, Gluc C1β.***

***(B) (Zoom) Spectres HRMAS proton découplé RMN $^{13}C$ d'extraits d'acide perchlorique de la zone S1BF au repos (bleu) et activée (rouge) pour un rat MCT4 et de la zone S1BF au repos (vert) et activée (violet) pour un rat UNIV après perfusion de [1-$^{13}C$]glucose. Ces spectres sont représentatifs des différents groupes. Les pics des métabolites d'intérêt sont numérotés : 1, Ala C3 ; 2, Lac C3 ; 3, Glu C3 ; 4, Gln C4 ; 5, Glu C4 ; 6, Glu C2.***

### 4.3. Edition hétéronucléaire: séquences POCE

Une séquence POCE a été utilisée pour déterminer les enrichissements spécifiques en $^{13}C$ des métabolites en utilisant la corrélation hétéronucléaire ($^{13}C$-$^{1}H$) [65]. Cette double séquence a permis l'acquisition successive d'un premier spectre correspondant à une expérience spin-écho standard sans aucune excitation $^{13}C$ et un second impliquant une impulsion d'inversion $^{13}C$ permettant un transfert de cohérence entre les noyaux $^{13}C$ et $^{1}H$ couplés. La soustraction de deux balayages alternatifs a entraîné la modification de spins $^{1}H$ couplés à des spins $^{13}C$ avec une constante de couplage scalaire $J_{CH}$ = 127 Hz. Le découplage $^{13}C$ pendant l'acquisition a réduit le couplage $^{1}H$-$^{13}C$ à une seule résonance $^{1}H$. Les angles de bascule pour les impulsions rectangulaires ont été soigneusement calibrés sur les deux canaux radiofréquences, avant chaque expérience pour le proton. Le délai de relaxation était de 8 s pour une relaxation longitudinale complète. L'enrichissement en $^{13}C$ a été calculé comme le rapport de la surface d'une résonance donnée sur le spectre $^{13}C$-$^{1}H$ édité à sa surface sur le spectre d'écho de spin standard (Figure 5 de l'article [66]). Des spectres types de RMN du proton acquis avec ces séquences POCE d'un extrait perchlorique de S1BF activé d'un rat UNIV sont présentés ***Figure 50***.

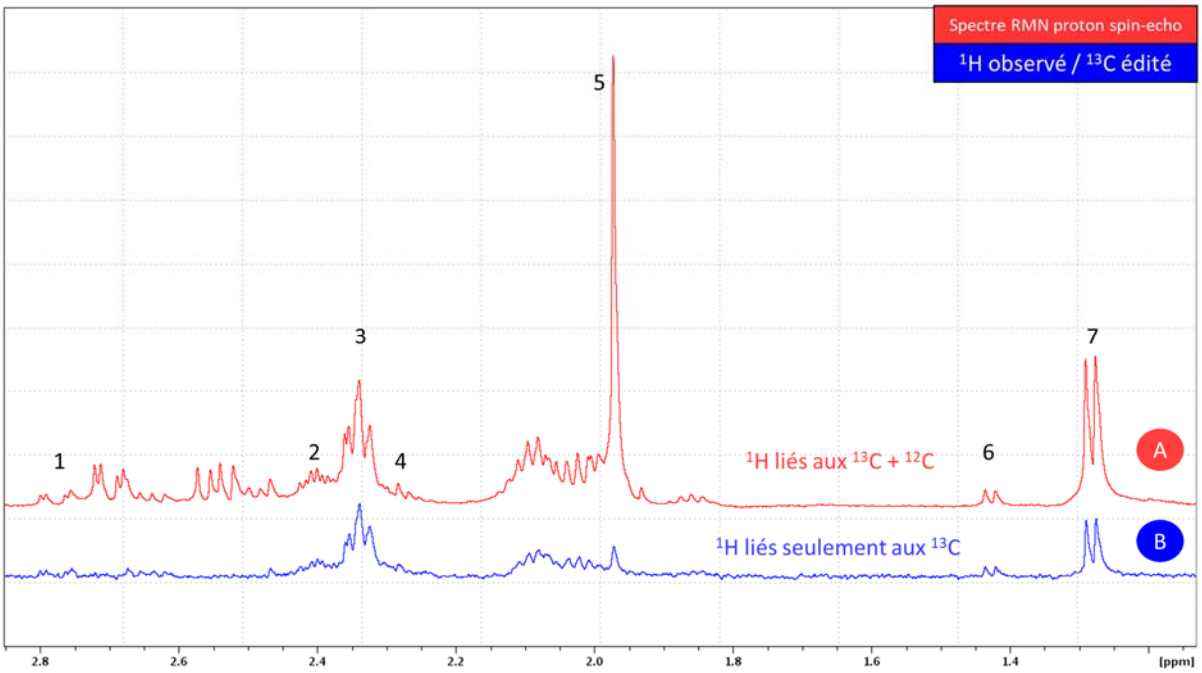



***Figure 50 : Illustration de la méthode de détermination de l'enrichissement en $^{13}C$ avec un spectre $^{1}H$-RMN spin-echo (rouge) et un spectre $^{1}H$ observé/$^{13}C$ édité (bleu) avec un facteur d'expansion. Les pics des métabolites d'intérêt sont numérotés : 1, Asp C3 ; 2, Gln C4 ; 3, Glu C4 ; 4, GABA C2 ; 5, N-acetylaspartate C6 ; 6, Ala C3 ; 7, lactate C3. L'enrichissement spécifique du lactate C3 (%) est obtenu par l'intégrale du pic 7 sur le spectre B divisé par celle du pic 7 sur le spectre A x 100.***

## 5. Devenir du [1-$^{13}C$]glucose

La spectroscopie de RMN du $^{13}C$ ayant le grand désavantage d'avoir une faible sensibilité, associée à une abondance naturelle basse (1,1 %) du $^{13}C$, la perfusion de [1-$^{13}C$]glucose (enrichi à 99 %) est donc nécessaire. Le devenir du [1-$^{13}C$]glucose est présenté ***Figure 51***. Une

molécule de [1-$^{13}$C]glucose donne, à l'issue de la glycolyse, une molécule de [3-$^{13}$C]pyruvate et une molécule de pyruvate non marqué: il existe donc une dilution isotopique de 50 % lorsqu'on part du [1-$^{13}$C]glucose. Par la suite, le [3-$^{13}$C]pyruvate peut soit donner du [3-$^{13}$C]lactate (LDH), soit de l'[3-$^{13}$C]alanine (aminotransférase), soit entrer dans le cycle de Krebs. Cette entrée peut se faire par deux voies distinctes: celle de la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui existe à la fois dans les neurones et les astrocytes, ou la voie de la pyruvate carboxylase (PC), qui, quant à elle, est exclusivement astrocytaire [67]. En passant par la voie de la PDH, le [3-$^{13}$C]pyruvate est transformé en [2-$^{13}$C]acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs pour donner du [4-$^{13}$C]citrate. Durant le premier tour du cycle de Krebs, le $^{13}$C est ensuite transféré sur le carbone 4 de l'α-cétoglutarate. En raison de la symétrie du fumarate, le marquage se retrouvera à 50 % sur le [2-$^{13}$C]oxaloacétate et à 50 % sur le [3-$^{13}$C]oxaloacétate. A partir du [4-$^{13}$C]α-cétoglutarate, on obtient du [4-$^{13}$C]glutamate puis de la [4-$^{13}$C]glutamine et du [2-$^{13}$C]GABA, alors que le [2-$^{13}$C] ou [3-$^{13}$C]oxaloacétate donne du [2-$^{13}$C] ou [3-$^{13}$C]aspartate (50%/50%). Selon la voie PC, le [3-$^{13}$C]pyruvate est converti en [3-$^{13}$C]oxaloacétate qui entre dans le cycle de Krebs. Lors du tour suivant du cycle de Krebs, le carbone marqué entré par la voie PC se retrouve sous la forme de [2-$^{13}$C]α-cétoglutarate : du [2-$^{13}$C]glutamate, puis de la [2-$^{13}$C]glutamine sont alors principalement formés. Sachant que la glutamine synthétase, l'enzyme qui permet la synthèse de glutamine à partir du glutamate, est exclusivement astrocytaire [40], le suivi de l'incorporation du $^{13}$C dans le carbone 2 de la glutamine va refléter l'activité PC. Le suivi des enrichissements des différents carbones du glutamate, un acide aminé neurotransmetteur qui s'accumule dans les neurones, va quant à lui refléter le marquage du métabolisme oxydatif neuronal. Plus le ratio C3/C4 augmente, plus le métabolisme oxydatif est actif.

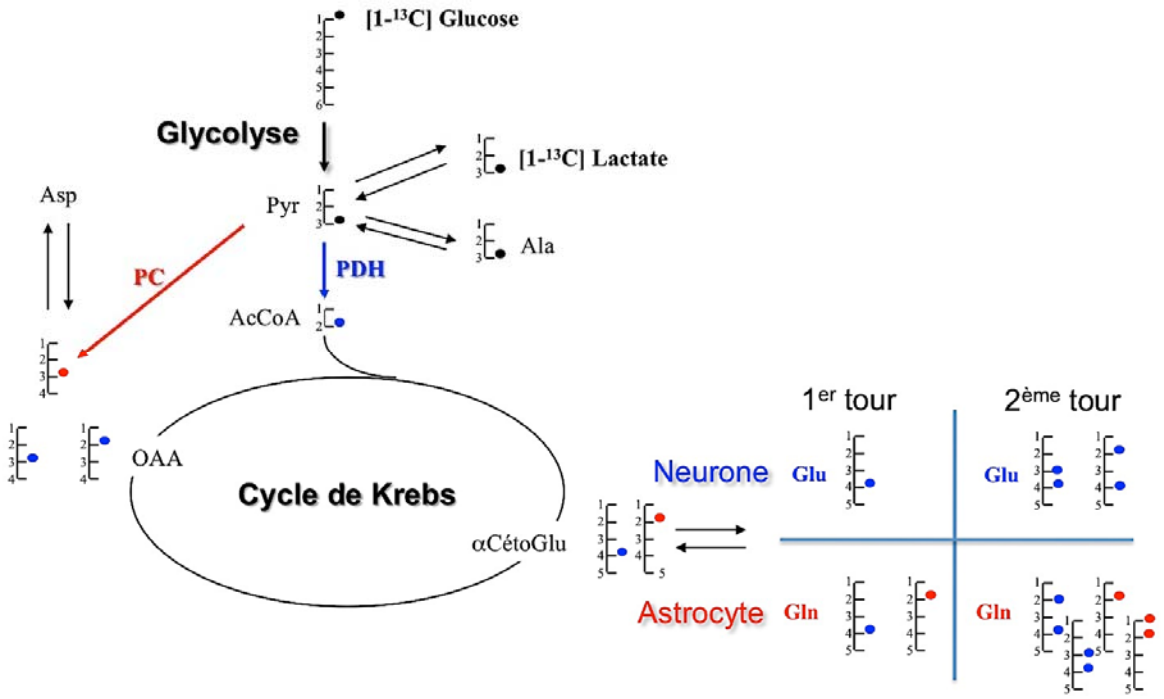



***Figure 51 : Représentation schématique du suivi du marquage au $^{13}$C à partir du métabolisme du [1-$^{13}$C] glucose, au cours des deux premiers tours du cycle de Krebs. Rond rouge : marquage du $^{13}$C suivant la voie de la PC, rond bleu : marquage du $^{13}$C suivant la voie de la PDH.***

# 6. Résultats

## 6.1. Enrichissements spécifiques

Les enrichissements spécifiques (en %) de certaines positions de carbones des métabolites cérébraux, après perfusion de [1-$^{13}$C]glucose, ont été mesurés et sont regroupés ***Tableau 5***.

| | UNIV | | MCT2 | | MCT4 | | MCT1-4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Repos | Activé | Repos | Activé | Repos | Activé | Repos | Activé |
| Lac C3 | 8,61±0,70 | 11,19±0,59 | 10,58±0,81 | 10,85±0,95 | 10,18±0,89 | 9,91±0,94 | 10,21±1,04 | 10,05±0,84 |
| Ala C3 | 12,49±0,75 | 13,97±0,95 | 13,62±0,61 | 13,93±1,11 | 13,04±0,70 | 13,29±0,72 | 13,41±0,82 | 11,97±0,82 |
| GABA C2 | 13,33±0,70 | 13,78±0,86 | 13,49±0,67 | 14,37±1,20 | 13,84±0,75 | 12,84±0,46 | 17,10±0,88 | 15,06±0,85 |
| Glu C4 | 13,23±1,13 | 12,95±1,11 | 14,33±0,87 | 13,16±1,54 | 12,38±0,99 | 13,43±0,85 | 12,82±1,55 | 10,78±1,54 |
| Gln C4 | 11,08±1,18 | 7,33±1,15 | 7,61±1,22 | 8,57±1,49 | 8,85±1,57 | 10,29±1,09 | 7,64±1,65 | 4,47±0,35 |
| Asp C3 | 9,71±1,09 | 11,72±1,27 | 10,23±0,98 | 12,06±0,89 | 9,11±0,80 | 10,29±0,89 | 9,51±0,95 | 8,77±1,53 |

***Tableau 5 : Enrichissements spécifiques (en %) dans le S1BF au repos ou activé de certaines positions carbonées des métabolites cérébraux, après 1 h de perfusion de [1-$^{13}$C]glucose. Les cases colorées indiquent une différence significative ($p < 0,05$, ANOVA suivi d'un test Fisher's LSD) entre l'état au repos et l'état activé. Lac C3 : carbone 3 du lactate, Ala C3 : carbone 3 de l'alanine, GABA C2 : carbone 2 du GABA, Glu C4 : carbone 4 du glutamate, Gln C4 : carbone 4 de la glutamine et Asp C3 : carbone 3 de l'aspartate. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes UNIV2 et UNIV4, par conséquent les données sont regroupées dans la même colonne. UNIV2 n = 4, MCT2 n = 8, UNIV4 n = 7, MCT4 n = 12 et MCT1-4 n = 4.***

Ces enrichissements spécifiques ont été déterminés à partir des spectres acquis avec les séquences d'édition hétéronucléaire (POCE, ***Figure 50***). Les résultats indiquent une augmentation statistique de l'enrichissement spécifique du carbone 3 du lactate entre l'état de repos et l'état activé pour les rats UNIV (UNIV2 et UNIV4) alors que celle du carbone 4 de la glutamine diminue. Aucune différence significative n'est trouvée pour les autres groupes de rats, pour aucun des métabolites.

L'évolution des enrichissements spécifiques du carbone 3 du lactate (en %) entre l'état de repos et l'état activé pour chaque rat individuel est représenté ***Figure 52***. Pour les rats UNIV, on voit bien que la stimulation des vibrisses a entraîné une augmentation d'incorporation de $^{13}$C dans le lactate, à partir du [1-$^{13}$C]glucose, dans le S1BF activé comparé au S1BF controlatéral. Pour les groupes MCT, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les S1BF droits et gauches.

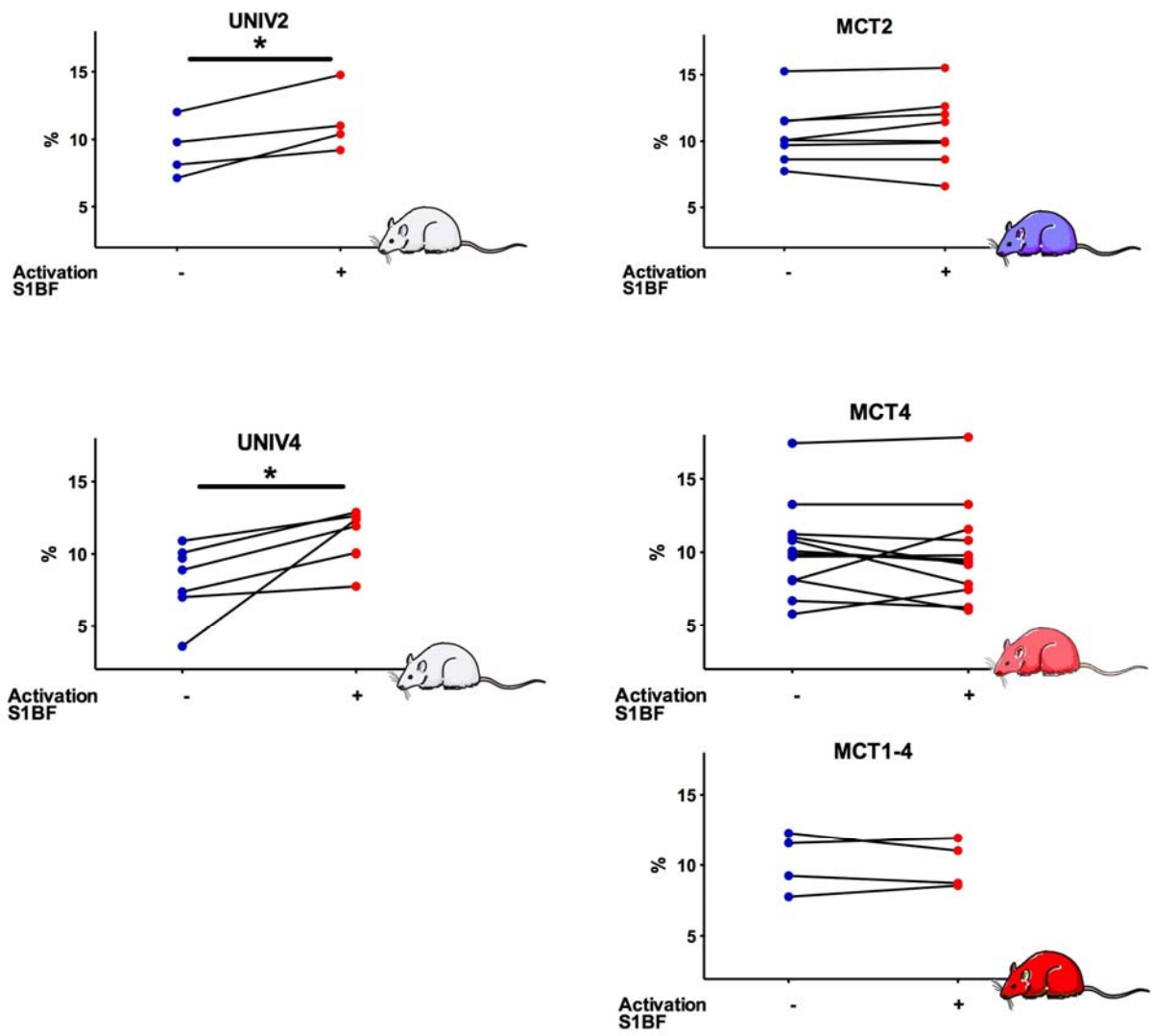



***Figure 52 : Evolution des enrichissements spécifiques du carbone 3 du lactate (en %) entre l'état de repos (S1BF droit, bleu) et l'état activé (S1BF gauche, rouge) pour chaque rat individuel. * p < 0,05, t-test apparié.***

## 6.2. Enrichissements relatifs

L'analyse des spectres de carbone 13 n'a pas pu mettre en évidence de différence significative entre les différents carbones (2, 3 et 4) que ce soit pour le glutamate comme pour la glutamine, quel que soit le groupe et quel que soit la condition (repos/activé). On note cependant une tendance dans tous groupes sauf MCT2 : le ratio C3/C4 du glutamate tend à augmenter lors de la stimulation des vibrisses, ce qui suggèrerait une accélération du cycle de Krebs neuronal, qui serait abolie lorsque le lactate ne peut pas entrer dans le neurone.

# Chapitre 5. Discussion et perspectives

## 1. Discussion

Les résultats obtenus en IRM fonctionnelle et spectroscopie fonctionnelle sur le lactate sont regroupés dans la ***Figure 53*** ci-dessous.

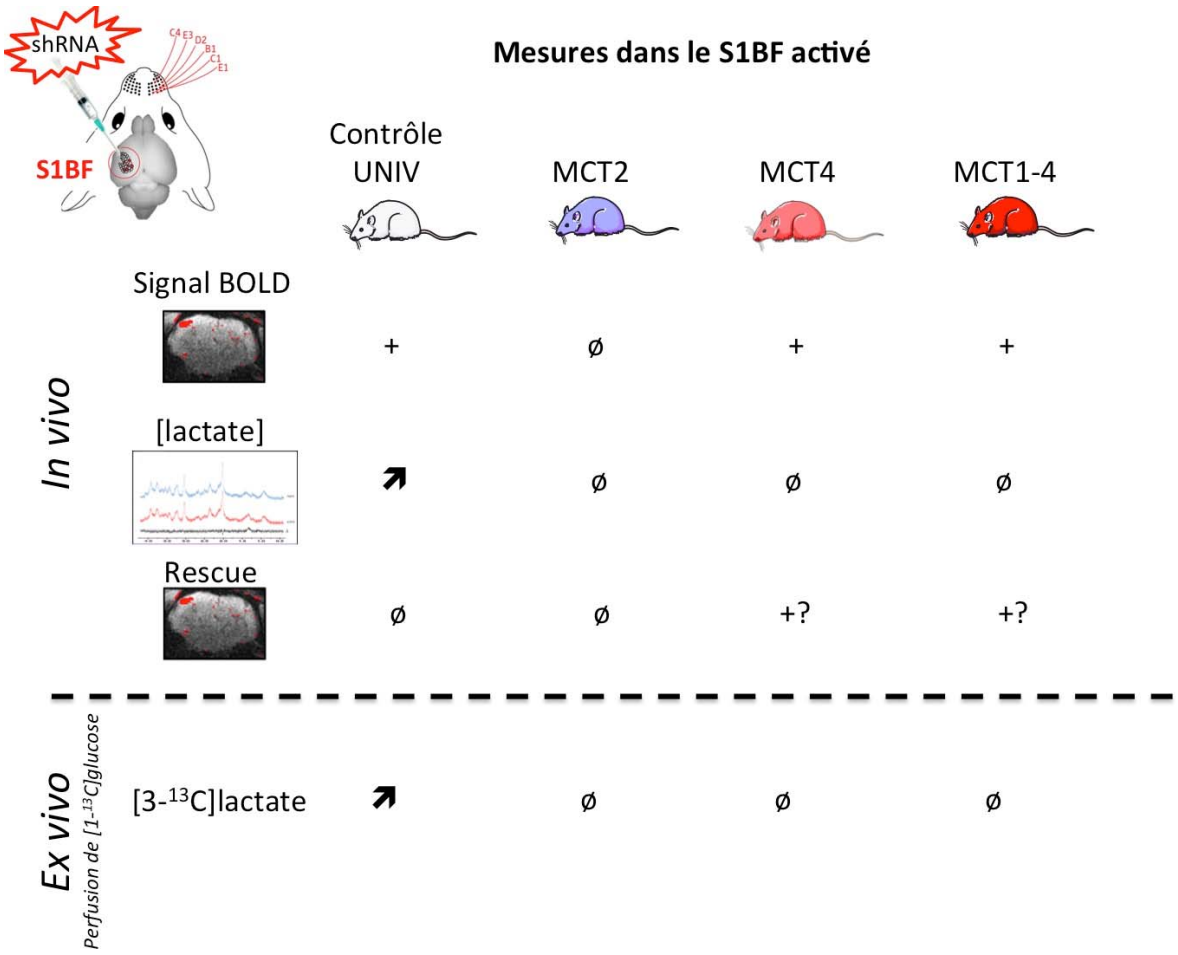



***Figure 53 : Synthèse des données obtenues in vivo et ex vivo et comparaison des résultats pour les différents groupes.***

- **Effet de la stimulation sur le signal BOLD et le métabolisme**

***Le système d'activation des vibrisses droites à l'intérieur de l'IRM est fonctionnel puisqu'il entraîne un signal positif BOLD dans le S1BF gauche des animaux contrôles. La spectroscopie localisée dans cette zone des tonneaux permet également de mettre en évidence une augmentation significative du lactate lors de leur stimulation.*** Cette hausse est d'environ 20 %. Si on prend 1 mM comme la valeur de la concentration de lactate extracellulaire dans le cerveau, on estime alors que sa concentration passe à 1,2 mM lors de l'activation. Cette hausse peut sembler faible, cependant il faut garder en tête que les échelles d'activation neuronale et d'enregistrement des données sont très différentes. Ce que l'on mesure donc

par spectroscopie (spectres acquis sur 5 min) reflète plutôt un nouvel état stationnaire, dans lequel la concentration de lactate est rehaussée. On peut penser que localement, à l'échelle de la synapse, et dans des échelles de temps < s, les concentrations de lactate peuvent être bien supérieures.

***Les résultats obtenus chez le rats UNIV sont identiques à ceux obtenus chez les rats contrôles.*** Les rats ayant reçu une injection dans les zones des tonneaux d'un AAV contenant une séquence ne ciblant aucun ARNm de la cellule répondent à la stimulation des vibrisses par un signal positif en BOLD et une augmentation de lactate. Il faut noter que si les niveaux d'activation et de bruit du signal BOLD sont identiques entre rats contrôles et UNIV, les augmentations de lactate mesurées en SRM semblent légèrement plus faibles chez les rats UNIV que chez les rats contrôles. Aucune différence significative n'est cependant mise en évidence. Cela laisse penser que l'injection des AAVs peut toutefois avoir un léger impact. L'aiguille pourrait avoir provoqué quelques lésions tissulaires sur son trajet, même si aucune gliose réactionnelle n'a pu être mise en évidence par Charlotte Jollé.

- **Complémentarité SRM fonctionnelle du $^{1}$H *in vivo* et du $^{13}$C *ex vivo***

***L'augmentation du lactate dans la zone cérébrale activée lors de la stimulation des vibrisses peut être expliquée soit par une augmentation de la synthèse de lactate lors de l'activité neuronale (hypothèse ANLS), soit par une diminution de sa consommation.*** L'utilisation de la SRM $^{13}$C va nous permettre de distinguer laquelle de ces hypothèses est la bonne.

En effet, la SRM du $^{1}$H permet la quantification du lactate dans le voxel analysé, mais sans information sur son origine ni son devenir. La spectroscopie RMN $^{13}$C permet quant à elle de suivre le devenir du marqueur perfusé : le [1-$^{13}$C]glucose, substrat sanguin majeur du cerveau. Au cours de la stimulation des vibrisses sous perfusion de [1-$^{13}$C]glucose, nous avons mesuré une augmentation de l'enrichissement spécifique de [3-$^{13}$C]lactate. Cela signifie que la stimulation neuronale entraîne une synthèse plus importante de lactate dans la zone activée. Par conséquent, ***l'augmentation de lactate mesurée en SRM du $^{1}$H in vivo provient de lactate nouvellement synthétisé, et donc enrichi en $^{13}$C, à partir du [1-$^{13}$C]glucose véhiculé par le sang***. Ce résultat, obtenu chez les rats UNIV, vient confirmer les précédents résultats obtenus au laboratoire en SRM $^{13}$C *ex vivo* sur des rats contrôles [68] et sur des rats modifiés génétiquement pour MCT2 avec une autre approche (injection de lentivirus au lieu d'AAVs) [69]. Dans la publication de *Sampol et al.*, les rats ont été perfusés avec du [1-$^{13}$C]glucose+lactate, ou du glucose+[3-$^{13}$C]lactate. Une comparaison directe n'est donc pas possible.

Bien que ce résultat montrant une augmentation de lactate dans la zone cérébrale activée lors de la stimulation des vibrisses soit compatible avec l'ANLS, la SRM du $^{1}$H *in vivo* ne possède pas la résolution nécessaire pour savoir dans quel compartiment a lieu cette augmentation. ***La glycolyse est-elle astrocytaire, comme proposé dans l'ANSL, ou bien neuronale, ce qui est avancé par les opposants à la navette lactate ?*** Là encore la SRM du $^{13}$C *ex vivo* peut apporter

un début de réponse. En effet, lorsque du [1-$^{13}$C]glucose est perfusé chez le rat, le $^{13}$C est incorporé au cours du premier tour du cycle de Krebs et marque le carbone 4 du glutamate. Le carbone 3 du glutamate ne sera marqué que lors du prochain tour du cycle de Krebs. Par conséquent, le ratio d'incorporation de $^{13}$C dans Glu C3 par rapport à celui dans Glu C4 reflète la vitesse du cycle de Krebs dans les neurones : plus ce ratio augmente, plus le cycle tourne vite et donc plus la probabilité pour avoir une molécule marquée au premier tour venir se condenser avec un acétyl-CoA marqué augmente et donc plus la quantité de molécules doublement enrichies en $^{13}$C augmente. Il existe du glutamate dans l'astrocyte, mais sa quantité est faible comparée à celle retrouvée dans le neurone (glutamatergique), où ce neurotransmetteur s'accumule [70]. Les mesures des enrichissements des différents carbones du glutamate étaient difficiles (spectres $^{13}$C avec un rapport signal/bruit très limite) mais on a pu noter une augmentation du ratio C3/C4 du glutamate entre l'état de repos et l'état activé. Cela indiquerait que la vitesse du cycle de Krebs neuronal augmenterait avec l'activité mais ce résultat est à prendre en compte avec précaution, car non significatif.

Ce qui est plus parlant, ce sont les mesures des enrichissements spécifiques du carbone 4 de la glutamine. Ce marquage provient de l'incorporation de $^{13}$C dans le cycle de Krebs, et reflète plus particulièrement son incorporation dans l'$\alpha$-cétoglutarate, précurseur de la glutamine. La glutamine synthétase étant une enzyme exclusivement astrocytaire [40], le suivi du marquage de la glutamine indique celui du cycle de Krebs astrocytaire. Les résultats obtenus sur les enrichissements spécifiques dans les rats contrôles et UNIV indiquent une diminution de l'incorporation de $^{13}$C dans le carbone 4 de la glutamine lors de la stimulation des vibrisses. Il y a donc moins de $^{13}$C qui entre dans le cycle de Krebs astrocytaire lors de l'activation cérébrale. On ne peut pas mettre de différence en évidence pour l'enrichissement spécifique du carbone 4 du glutamate.
En résumé, lors de l'activation neuronale, le [1-$^{13}$C]glucose est consommé en plus grande quantité (on voit d'ailleurs son pic diminuer/disparaitre des spectres $^{13}$C dans les S1BF activés comparé aux S1BF controlatéraux), ***à l'issue de la glycolyse, le [3-$^{13}$C]pyruvate est métabolisé de façon plus importante par la voie de la LDH et produit plus de [3-$^{13}$C]lactate. En parallèle, moins de [3-$^{13}$C]pyruvate entre dans le cycle de Krebs astrocytaire (via le [2-$^{13}$C]acétyl-CoA), conduisant ainsi à une diminution de l'enrichissement de la glutamine. On peut en déduire que l'augmentation de la glycolyse et de la production de lactate lors de l'activation neuronale, se fait dans le compartiment astrocytaire, ce qui vient soutenir l'hypothèse de l'ANLS***.

- **Impact de la répression du transporteur au lactate neuronal, le MCT2**

***Pour les rats ayant subis une répression du transporteur au lactate neuronal (MCT2), l'augmentation de lactate n'est plus mesurée par SRM du $^{1}$H in vivo***. Ce résultat peut sembler surprenant dans un premier temps. En effet, si le lactate est produit dans le compartiment astrocytaire, et si le lactate ne peut plus être consommé par le neurone (plus de MCT2), alors on aurait pu penser que le lactate se serait accumulé dans l'espace extracellulaire. Or ce n'est pas le cas. L'explication vient des résultats d'IRMf : ***on perd également le signal BOLD*** dans la

zone S1BF du cortex somatosensoriel activé. L'hypothèse la plus probable est donc une perte de l'activation neuronale lorsque l'on perd le transporteur MCT2. Sachant que le transporteur au glucose est toujours présent sur les neurones, qui peuvent donc utiliser le glucose comme substrat énergétique, ce résultat soutient fortement la nécessité d'avoir un apport énergétique sous forme de lactate au neurone. Une autre hypothèse serait que la suppression de MCT2 à la membrane de la synapse perturbe d'autres protéines membranaires importantes pour l'activation neuronale, comme les récepteurs glutamatergiques. Un lien entre le recyclage de MCT2 et GluR2/3, une sous unité du récepteur AMPA, a d'ailleurs pu être montré par l'équipe de Luc Pellerin [71]. Pour démontrer le lien entre perte d'activité synaptique et perte de MCT2, des études d'électrophysiologie, au plus près de la synapse, seraient utiles.

- **Impact de la répression du transporteur au lactate astrocytaire**

Pour les rats ayant subis une répression du transporteur au lactate astrocytaire MCT4, les résultats obtenus se placent dans une situation intermédiaire entre ceux obtenus pour les rats MCT2 et ceux obtenus pour les rats UNIV. Le signal BOLD est présent dans environ la moitié des cas ce qui laisse penser que ***l'activation cérébrale n'est pas complètement perdue. Cependant, les mesures de SRM du $^{1}$H in vivo ne permettent pas de mettre en évidence une différence de concentration de lactate entre l'état repos et l'état activé.***

À la différence des neurones qui ne possèdent que l'isoforme MCT2, les astrocytes expriment à la fois les isoformes 1 et 4. On peut alors penser que pour les rats MCT4, la présence des transporteurs MCT1 permet un léger export de lactate. Cet export serait insuffisant pour mesurer le même niveau d'état stationnaire que celui mesuré chez les rats UNIV ou contrôles lors de l'activation par SRM, mais serait suffisant pour maintenir l'existence du signal BOLD dans la zone activée. En effet, si un peu de lactate sort de l'astrocyte, il peut alors être utilisé par les neurones. S'il est utilisé de façon importante, comme lors de l'activation cérébrale, alors le lactate ne peut pas s'accumuler dans l'espace extracellulaire et aucune augmentation ne peut être mesurée en SRM du $^{1}$H *in vivo*. Suivant cette hypothèse, les astrocytes en temps normal fourniraient donc plus de lactate qu'il n'est nécessaire aux neurones.

Pour les rats MCT1-4, les deux isoformes sont cette fois réprimées. On trouve, comme pour les rats MCT4, une absence d'augmentation du lactate par SRM du $^{1}$H *in vivo* lors de l'activation cérébrale. Le signal BOLD, quant à lui, est toujours détecté chez certains animaux mais l'intensité du signal BOLD est plus faible que chez les rats MCT4. Le fait d'avoir réprimé les deux isoformes devrait empêcher la sortie du lactate des astrocytes. Il devrait en résulter une perte du signal BOLD, comme chez les rats MCT2. Or, ici il reste un signal positif en BOLD qui peut être dû soit à une entrée de lactate présent naturellement (1 mM dans le cerveau) dans le compartiment extracellulaire dans le neurone malgré l'absence de production par les astrocytes, soit à une répression faible de MCT1 *in vivo*. En effet, si Charlotte Jollé a pu montrer que MCT4 était réprimé à hauteur de plus de 50 % au niveau de la protéine *in vivo* après

injections des AAVs, la mesure n'a pas encore été faite pour MCT1. Seules les mesures de répression *in vitro* ont été mesurées et elle a pu montrer que la répression était moins efficace.

***Les résultats de ce travail ont pu montrer que :***

- ***Le lactate qui augmente lors de l'activation cérébrale provient d'une augmentation de la consommation de glucose sanguin et d'une augmentation de la synthèse de lactate, qui a lieu le plus probablement dans le compartiment astrocytaire.***
- ***Les transporteurs au lactate sont essentiels dans le couplage neurométabolique neurone-astrocyte.***
- ***Le transporteur au lactate neuronal est essentiel pour le couplage neurovasculaire et, nous pensons, pour l'activité synaptique.***

## 2. Critiques et perspectives

Concernant le modèle expérimental, un point critique est que nous n'avons pas les moyens de vérifier à posteriori des expériences de SRM et d'IRMf si les transfections effectuées en amont étaient efficaces. On ne peut pas exclure que pour certains animaux les transfections n'aient pas eu lieu. Si l'on ne se pose pas ces questions pour les rats UNIV et MCT2, cela devient plus problématique pour les rats MCT4 et MCT1-4, qui répondent de façon intermédiaire. Une situation idéale serait de travailler dans l'avenir sur des souris transgéniques. Ces lignées de souris viennent d'être créées par Luc Pellerin (souris floxées, car suppression des MCTs létale). Il faudra pour cela de nouveau améliorer les acquisitions *in vivo*. La taille de leur cerveau est en effet plus petite, on passe alors pour le S1BF d'une taille de 15 µL chez le rat (taille du voxel dans ce travail) à un peu moins de 2 µL chez la souris...

Dans cette étude, le signal BOLD a été utilisé afin de valider l'activation cérébrale ou non. Pour le traitement des données d'IRMf, une amélioration de la quantification aurait pu être effectuée. Des méthodes de quantification plus abouties permettent de déterminer très précisément l'intensité du signal BOLD, ce qui n'a pas été fait dans ce travail. Je me suis en effet plus focalisé sur la SRM. Des segmentations virtuelles très précises de la zone S1BF et un calcul optimisé des variations hémodynamiques pourraient être des éléments d'amélioration de la technique de quantification utilisée.

Les spectres issus des données de spectroscopie RMN $^{13}C$ *ex vivo* acquises pour la quantité de matière d'un seul échantillon de S1BF avaient un rapport signal sur bruit trop faible. La quantification a été délicate. Le fait de combiner les échantillons d'un groupe de rat permettrait d'améliorer considérablement le signal sur bruit et la quantification des spectres. Nous avons également un doute sur la méthode d'extraction, que nous avons voulu changer pour limiter la perte d'échantillon par rapport à une technique classique d'extraction (broyage dans un mortier rempli d'azote liquide). Cette technique n'a certainement pas permis d'extraire aussi bien les métabolites ce qui expliquerait le faible RSB.

Il serait intéressant de réaliser des expériences de TEP sur ces animaux également. Le microTEP, un scanner conçu pour les petits animaux, pourrait être utilisé pour mesurer les consommations de glucose. Nous avions planifié de faire ces expériences, et je suis allé à Toulouse sur la plateforme où est la microTEP pour mettre en place le protocole d'injection du traceur, le [$^{18}$F]fluorodésoxyglucose, sur un rat avec stimulation de vibrisses. Le protocole a été difficile à mettre en œuvre, et le post-processing n'était pas concluant. En effet, les personnes qui procédaient au traitement des données avaient l'habitude de travailler sur des modèles de cancérologie, où l'augmentation de la consommation de glucose est évidente. Après deux essais infructueux, nous avons établi une collaboration avec Eduardo Zimmer, au Brésil, qui a récupéré les images et procédé au traitement des données. Il a appliqué le même traitement que celui qu'il avait déjà développé sur un modèle d'activation de vibrisses [72]. Un résultat préliminaire est montré ***Figure 54*** et indique que l'on peut mettre en évidence une augmentation de la consommation de glucose lors de l'activation des vibrisses dans le S1BF. Notre objectif sera de refaire ces expériences sur les rats MCTs. Les résultats de consommation de glucose viendront s'ajouter à ceux obtenus dans cette thèse.

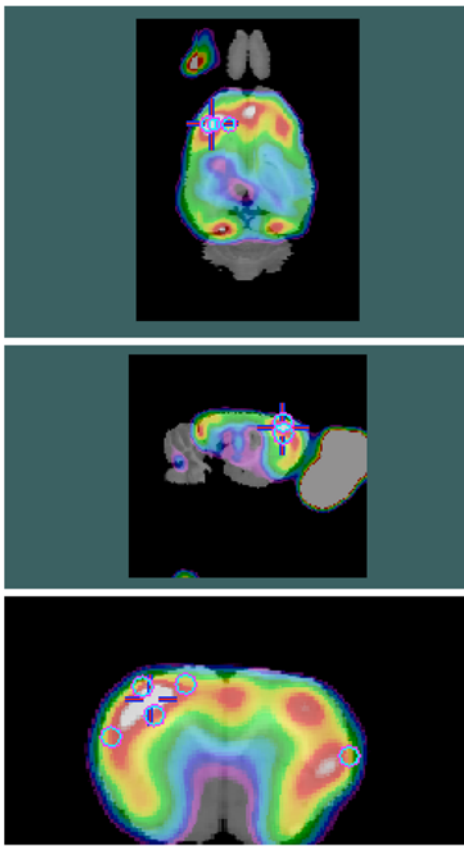


***Figure 54 : Moyenne de mesure de capture de FDG pour 4 rats. Le FDG a été injecté en bolus à 4 rats contrôles anesthésiés sous médétomidine. Une stimulation des vibrisses droites a été réalisée pendant 20 minutes à l'issue desquelles les acquisitions TEP ont été effectuées.***

# Bibliographie

[1] R.A. Brauch, M. Adnan El-Masri, J.C. Parker, Jr., R.S. El-Mallakh, Glial cell number and neuron/glial cell ratios in postmortem brains of bipolar individuals, J Affect Disord, 91 (2006) 87-90.
[2] P.J. Magistretti, L. Pellerin, Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain, News Physiol Sci, 14 (1999) 177-182.
[3] L. Sokoloff, R. Mangold, R.L. Wechsler, C. Kenney, S.S. Kety, The effect of mental arithmetic on cerebral circulation and metabolism, J Clin Invest, 34 (1955) 1101-1108.
[4] P.T. Fox, M.E. Raichle, Stimulus rate dependence of regional cerebral blood flow in human striate cortex, demonstrated by positron emission tomography, J Neurophysiol, 51 (1984) 1109-1120.
[5] C.S. Roy, C.S. Sherrington, On the Regulation of the Blood-supply of the Brain, J Physiol, 11 (1890) 85-158 117.
[6] L. Sokoloff, Local cerebral energy metabolism: its relationship to local functional activity and blood flow, Bull Schweiz Akad Med Wiss, 36 (1980) 71-91.
[7] P.T. Fox, M.E. Raichle, M.A. Mintun, C. Dence, Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity, Science, 241 (1988) 462-464.
[8] S. Ogawa, T.M. Lee, A.R. Kay, D.W. Tank, Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation, Proc Natl Acad Sci U S A, 87 (1990) 9868-9872.
[9] L. Pauling, C.D. Coryell, The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin, Proc Natl Acad Sci U S A, 22 (1936) 210-216.
[10] J.W. Belliveau, B.R. Rosen, H.L. Kantor, R.R. Rzedzian, D.N. Kennedy, R.C. McKinstry, J.M. Vevea, M.S. Cohen, I.L. Pykett, T.J. Brady, Functional cerebral imaging by susceptibility-contrast NMR, Magn Reson Med, 14 (1990) 538-546.
[11] K.K. Kwong, J.W. Belliveau, D.A. Chesler, I.E. Goldberg, R.M. Weisskoff, B.P. Poncelet, D.N. Kennedy, B.E. Hoppel, M.S. Cohen, R. Turner, et al., Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation, Proc Natl Acad Sci U S A, 89 (1992) 5675-5679.
[12] J. Prichard, D. Rothman, E. Novotny, O. Petroff, T. Kuwabara, M. Avison, A. Howseman, C. Hanstock, R. Shulman, Lactate rise detected by 1H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation, Proc Natl Acad Sci U S A, 88 (1991) 5829-5831.
[13] D. Sappey-Marinier, G. Calabrese, G. Fein, J.W. Hugg, C. Biggins, M.W. Weiner, Effect of photic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using 1H and 31P magnetic resonance spectroscopy, J Cereb Blood Flow Metab, 12 (1992) 584-592.
[14] L. Pellerin, P.J. Magistretti, Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization, Proc Natl Acad Sci U S A, 91 (1994) 10625-10629.
[15] L. Pellerin, L.H. Bergersen, A.P. Halestrap, K. Pierre, Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain, J Neurosci Res, 79 (2005) 55-64.
[16] J. Perez-Escuredo, V.F. Van Hee, M. Sboarina, J. Falces, V.L. Payen, L. Pellerin, P. Sonveaux, Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer, Biochim Biophys Acta, 1863 (2016) 2481-2497.

[17] H. Langemann, B. Alessandri, A. Mendelowitsch, T. Feuerstein, H. Landolt, O. Gratzl, Extracellular levels of glucose and lactate measured by quantitative microdialysis in the human brain, Neurol Res, 23 (2001) 531-536.
[18] N. Cholet, L. Pellerin, E. Welker, P. Lacombe, J. Seylaz, P. Magistretti, G. Bonvento, Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation, J Cereb Blood Flow Metab, 21 (2001) 404-412.
[19] B. Voutsinos-Porche, G. Bonvento, K. Tanaka, P. Steiner, E. Welker, J.Y. Chatton, P.J. Magistretti, L. Pellerin, Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex, Neuron, 37 (2003) 275-286.
[20] A.K. Bouzier-Sore, P. Voisin, P. Canioni, P.J. Magistretti, L. Pellerin, Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture, J Cereb Blood Flow Metab, 23 (2003) 1298-1306.
[21] A.K. Bouzier-Sore, P. Voisin, V. Bouchaud, E. Bezancon, J.M. Franconi, L. Pellerin, Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study, Eur J Neurosci, 24 (2006) 1687-1694.
[22] F. Boumezbeur, K.F. Petersen, G.W. Cline, G.F. Mason, K.L. Behar, G.I. Shulman, D.L. Rothman, The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy, J Neurosci, 30 (2010) 13983-13991.
[23] C.N. Gallagher, K.L. Carpenter, P. Grice, D.J. Howe, A. Mason, I. Timofeev, D.K. Menon, P.J. Kirkpatrick, J.D. Pickard, G.R. Sutherland, P.J. Hutchinson, The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a 13C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study, Brain, 132 (2009) 2839-2849.
[24] B. Quistorff, N.H. Secher, J.J. Van Lieshout, Lactate fuels the human brain during exercise, Faseb J, 22 (2008) 3443-3449.
[25] O.H. Porras, A. Loaiza, L.F. Barros, Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons, J Neurosci, 24 (2004) 9669-9673.
[26] B. Voutsinos-Porche, G. Knott, K. Tanaka, C. Quairiaux, E. Welker, G. Bonvento, Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex, Cereb Cortex, 13 (2003) 1110-1121.
[27] E.R. Zimmer, M.J. Parent, A. Leuzy, A. Aliaga, A. Aliaga, L. Moquin, E.S. Schirrmacher, J.P. Soucy, I. Skelin, A. Gratton, S. Gauthier, P. Rosa-Neto, Imaging in vivo glutamate fluctuations with [(11)C]ABP688: a GLT-1 challenge with ceftriaxone, J Cereb Blood Flow Metab, 35 (2015) 1169-1174.
[28] I.A. Simpson, D. Dwyer, D. Malide, K.H. Moley, A. Travis, S.J. Vannucci, The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction, Am J Physiol Endocrinol Metab, 295 (2008) E242-253.
[29] G.A. Dienel, Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain, J Neurosci Res, 95 (2017) 2103-2125.
[30] C.M. Diaz-Garcia, R. Mongeon, C. Lahmann, D. Koveal, H. Zucker, G. Yellen, Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake, Cell Metab, 26 (2017) 361-374 e364.
[31] I. Lundgaard, B. Li, L. Xie, H. Kang, S. Sanggaard, J.D. Haswell, W. Sun, S. Goldman, S. Blekot, M. Nielsen, T. Takano, R. Deane, M. Nedergaard, Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism, Nat Commun, 6 (2015) 6807.

[32] T.M. Mathiisen, K.P. Lehre, N.C. Danbolt, O.P. Ottersen, The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction, Glia, 58 (2010) 1094-1103.
[33] J.L. Kovar, W. Volcheck, E. Sevick-Muraca, M.A. Simpson, D.M. Olive, Characterization and performance of a near-infrared 2-deoxyglucose optical imaging agent for mouse cancer models, Anal Biochem, 384 (2009) 254-262.
[34] L.K. Bak, A.B. Walls, CrossTalk opposing view: lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain, J Physiol, 596 (2018) 351-353.
[35] L.F. Barros, B. Weber, CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain, J Physiol, 596 (2018) 347-350.
[36] A. Haase, J. Frahm, D. Matthaei, W. Hanicke, H. Bomsdorf, D. Kunz, R. Tischler, MR imaging using stimulated echoes (STEAM), Radiology, 160 (1986) 787-790.
[37] P.A. Bottomley, Selective volume method for performing localized NMR spectroscopy, 1984.
[38] M. Garwood, L. DelaBarre, The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR, J Magn Reson, 153 (2001) 155-177.
[39] H. Zhu, P.B. Barker, MR spectroscopy and spectroscopic imaging of the brain, Methods Mol Biol, 711 (2011) 203-226.
[40] A. Martinez-Hernandez, K.P. Bell, M.D. Norenberg, Glutamine synthetase: glial localization in brain, Science, 195 (1977) 1356-1358.
[41] S.W. Provencher, Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra, Magn Reson Med, 30 (1993) 672-679.
[42] http://s-provencher.com/pages/lcmodel.shtml.
[43] L. Vanhamme, A. van den Boogaart, S. Van Huffel, Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge, J Magn Reson, 129 (1997) 35-43.
[44] A. Naressi, C. Couturier, I. Castang, R. de Beer, D. Graveron-Demilly, Java-based graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals, Comput Biol Med, 31 (2001) 269-286.
[45] http://carbon.uab.es/mrui.
[46] M. Kanowski, J. Kaufmann, J. Braun, J. Bernarding, C. Tempelmann, Quantitation of simulated short echo time 1H human brain spectra by LCModel and AMARES, Magn Reson Med, 51 (2004) 904-912.
[47] S. Provencher, A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations, Computer Physics Communications 27, (1982) pp. 213-227.
[48] F. Romeo, D.I. Hoult, Magnet field profiling: analysis and correcting coil design, Magn Reson Med, 1 (1984) 44-65.
[49] R. Gruetter, G. Adriany, I.Y. Choi, P.G. Henry, H. Lei, G. Oz, Localized in vivo 13C NMR spectroscopy of the brain, NMR Biomed, 16 (2003) 313-338.
[50] F. Boumezbeur, L. Besret, J. Valette, F. Vaufrey, P.G. Henry, V. Slavov, E. Giacomini, P. Hantraye, G. Bloch, V. Lebon, NMR measurement of brain oxidative metabolism in monkeys using 13C-labeled glucose without a 13C radiofrequency channel, Magn Reson Med, 52 (2004) 33-40.

[51] I.Y. Choi, I. Tkac, K. Ugurbil, R. Gruetter, Noninvasive measurements of [1-(13)C]glycogen concentrations and metabolism in rat brain in vivo, J Neurochem, 73 (1999) 1300-1308.
[52] J. Valette, M. Chaumeil, M. Guillermier, G. Bloch, P. Hantraye, V. Lebon, Diffusion-weighted NMR spectroscopy allows probing of 13C labeling of glutamate inside distinct metabolic compartments in the brain, Magn Reson Med, 60 (2008) 306-311.
[53] L. Li, C. Weiss, A.C. Talk, J.F. Disterhoft, A.M. Wyrwicz, A MRI-compatible system for whisker stimulation, J Neurosci Methods, 205 (2012) 305-311.
[54] D. Feldmeyer, Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex, Front Neuroanat, 6 (2012) 24.
[55] T.B. Leergaard, K.A. Lyngstad, J.H. Thompson, S. Taeymans, B.P. Vos, E. De Schutter, J.M. Bower, J.G. Bjaalie, Rat somatosensory cerebropontocerebellar pathways: spatial relationships of the somatotopic map of the primary somatosensory cortex are preserved in a three-dimensional clustered pontine map, J Comp Neurol, 422 (2000) 246-266.
[56] C.C. Petersen, The barrel cortex--integrating molecular, cellular and systems physiology, Pflugers Arch, 447 (2003) 126-134.
[57] R. Makaryus, H. Lee, M. Yu, S. Zhang, S.D. Smith, M. Rebecchi, P.S. Glass, H. Benveniste, The metabolomic profile during isoflurane anesthesia differs from propofol anesthesia in the live rodent brain, J Cereb Blood Flow Metab, 31 (2011) 1432-1442.
[58] T. Horn, J. Klein, Lactate levels in the brain are elevated upon exposure to volatile anesthetics: a microdialysis study, Neurochem Int, 57 (2010) 940-947.
[59] J.M. Adamczak, T.D. Farr, J.U. Seehafer, D. Kalthoff, M. Hoehn, High field BOLD response to forepaw stimulation in the mouse, Neuroimage, 51 (2010) 704-712.
[60] A.C. Silva, A.P. Koretsky, Laminar specificity of functional MRI onset times during somatosensory stimulation in rat, Proc Natl Acad Sci U S A, 99 (2002) 15182-15187.
[61] J. Valette, J.Y. Park, O. Grohn, K. Ugurbil, M. Garwood, P.G. Henry, Spectroscopic imaging with volume selection by unpaired adiabatic pi pulses: theory and application, J Magn Reson, 189 (2007) 1-12.
[62] G. Castellano, C.S. Dias, B. Foerster, L.M. Li, R.J. Covolan, NAA and NAAG variation in neuronal activation during visual stimulation, Braz J Med Biol Res, 45 (2012) 1031-1036.
[63] S. Mangia, I. Tkac, R. Gruetter, P.F. Van de Moortele, B. Maraviglia, K. Ugurbil, Sustained neuronal activation raises oxidative metabolism to a new steady-state level: evidence from 1H NMR spectroscopy in the human visual cortex, J Cereb Blood Flow Metab, 27 (2007) 1055-1063.
[64] T.B. Rodrigues, J. Valette, A.K. Bouzier-Sore, C NMR spectroscopy applications to brain energy metabolism, Front Neuroenergetics, 5 (2013) 9.
[65] D.L. Rothman, K.L. Behar, H.P. Hetherington, J.A. den Hollander, M.R. Bendall, O.A. Petroff, R.G. Shulman, 1H-Observe/13C-decouple spectroscopic measurements of lactate and glutamate in the rat brain in vivo, Proc Natl Acad Sci U S A, 82 (1985) 1633-1637.
[66] A.K. Bouzier-Sore, S. Serres, P. Canioni, M. Merle, Lactate involvement in neuron-glia metabolic interaction: (13)C-NMR spectroscopy contribution, Biochimie, 85 (2003) 841-848.
[67] R.P. Shank, G.S. Bennett, S.O. Freytag, G.L. Campbell, Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools, Brain Res, 329 (1985) 364-367.
[68] D. Sampol, E. Ostrofet, M.L. Jobin, G. Raffard, S. Sanchez, V. Bouchaud, J.M. Franconi, G. Bonvento, A.K. Bouzier-Sore, Glucose and lactate metabolism in the awake and stimulated rat: a (13)C-NMR study, Front Neuroenergetics, 5 (2013) 5.

[69] L. Mazuel, J. Blanc, C. Repond, V. Bouchaud, G. Raffard, N. Deglon, G. Bonvento, L. Pellerin, A.K. Bouzier-Sore, A neuronal MCT2 knockdown in the rat somatosensory cortex reduces both the NMR lactate signal and the BOLD response during whisker stimulation, PLoS One, 12 (2017) e0174990.
[70] S. Berl, D.D. Clarke, Compartmentation of amino acid metabolism, in: A. Lajtha (Ed.) Handbook of Neurochemistry, Plenum press, Place Published, 1969, pp. 447-473.
[71] K. Pierre, J.Y. Chatton, A. Parent, C. Repond, F. Gardoni, M. Di Luca, L. Pellerin, Linking supply to demand: the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 and the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor GluR2/3 subunit are associated in a common trafficking process, Eur J Neurosci, (2009).
[72] E.R. Zimmer, M.J. Parent, D.G. Souza, A. Leuzy, C. Lecrux, H.-I. Kim, S. Gauthier, L. Pellerin, E. Hamel, P. Rosa-Neto, [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport, Nature Neuroscience, online 30 January 2017 (2017).

**Titre : Modifications métaboliques lors de l'activation cérébrale :**
**Suivi par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13**

Résumé : Le lactate est considéré comme un métabolite déchet depuis de très nombreuses années. Cependant, cette vision semble revisitée depuis quelques temps, avec l'apparition de la notion de glycolyse aérobie et de navettes lactate dans différents types cellulaires (muscle, cerveau et sperme). Concernant le cerveau, des études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* réalisées ces 20 dernières années ont montré, d'une part, que les astrocytes produisent du lactate et d'autre part que le lactate pouvait être un substrat énergétique pour le système nerveux central (SNC), et plus particulièrement les neurones. Cette notion de navette lactate entre astrocyte et neurone a été proposée pour la première fois en 1994 par Pellerin et Magistretti (ANLS, pour astrocyte-neuron lactate shuttle). Malgré de nombreuses recherches depuis, l'existence d'un transfert net de lactate entre les astrocytes et les neurones n'a toujours pas pu être démontrée *in vivo*. Dans cet optique, la visualisation de la production de lactate *in vivo* dans le cerveau activé est essentielle. Le rôle des transporteurs au lactate, MCTs (Monocarboxylate Transporters), dans la détection de ce signal est également un point capital. L'objectif de cette thèse a été de développer la spectroscopie de RMN *in vivo* localisée dans le cortex somato-sensoriel du rat en condition d'activation cérébrale. Dans un premier temps, un travail de développement a été effectué afin de mettre au point le protocole de stimulation neuronale et d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant pour pouvoir quantifier de façon fiable le lactate. Une fois le protocole établi sur des rats contrôles, l'étude a été réalisée sur des rats modifiés génétiquement et réprimés pour le MCT, soit neuronal, soit astrocytaire. Le but était de déterminer si ce partenaire clef de l'ANLS avait une influence sur les fluctuations de lactate lors de l'activation cérébrale. En plus de la spectroscopie proton *in vivo* et de l'IRM fonctionnelle, des études de RMN du carbone-13 ont été réalisées *ex vivo*. Le résultat majeur de cette thèse montre qu'en l'absence du transporteur de lactate neuronal, non seulement on perd l'augmentation de lactate lors de la stimulation cérébrale mais on perd également le signal BOLD sur l'IRMf. Ce résultat suggère, et ce pour la première fois, que l'activité neuronale est fortement dépendante du transporteur au lactate.

**Mots clés :** spectroscopie RMN, IRM fonctionnelle, lactate, astrocyte, MCT

---

**Title : Metabolic changes during brain activation:**
**Study by nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton and carbon 13**

Abstract : Lactate has been considered as a waste metabolite for many years. However, this vision has been reconsidered recently, with the appearance of the notion of aerobic glycolysis and lactate shuttles in different cell types (muscle, brain, and sperm). Concerning the brain, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies carried out over the last 20 years have shown, on the one hand, that astrocytes produce lactate and, on the other hand, that lactate can be an energetic substrate for the central nervous system (CNS), and more particularly neurons. This lactate shuttle between astrocyte and neuron was first proposed in 1994 by Pellerin and Magistretti (called ANLS, for astrocyte-neuron lactate shuttle). Despite many studies since then, the existence of a net transfer of lactate between astrocytes and neurons has still not been demonstrated *in vivo*. In this regard, visualization of lactate production *in vivo* in the activated brain is essential. The role of lactate transporters, MCTs (Monocarboxylate Transporters), in detecting this signal is also a key issue. The objective of this thesis was to develop *in vivo* NMR spectroscopy located in the somato-sensory cortex of rats under brain activation conditions. First, experiments were carried out to develop the neural stimulation protocol and to obtain a sufficient signal-to-noise ratio to be able to quantify lactate. Once the protocol was established on control rats, the study was performed on genetically modified rats and down-regulated for MCT, either neuronal or astrocytic. The aim was to determine whether this key partner of the ANLS has an influence on lactate fluctuations during brain activation. In addition to *in vivo* proton spectroscopy and functional MRI, carbon-13 NMR studies were performed *ex vivo*. The major result of this thesis shows that in the absence of the neuronal lactate transporter, not only is the increase in lactate lost during brain stimulation but the BOLD signal on the fMRI is also lost. This result suggests, for the first time, that neural activity is highly dependent on the lactate transporter.

**Keywords :** NMR spectroscopy, functional MRI, lactate, astrocyte, MCT

---

**Unité de recherche :** **CRMSB (Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques)**
**UMR 5536 - 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cédex**