



**HAL**  
open science

# Spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion pour l'étude de la compartimentation du lactate cérébral

Sophie Malaquin

► **To cite this version:**

Sophie Malaquin. Spectroscopie RMN in vivo pondérée en diffusion pour l'étude de la compartimentation du lactate cérébral. Physique Médicale [physics.med-ph]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPAST196 . tel-04379936

**HAL Id: tel-04379936**

**<https://theses.hal.science/tel-04379936>**

Submitted on 8 Jan 2024

**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.

# Spectroscopie RMN *in vivo* pondérée en diffusion pour l'étude de la compartmentation du lactate cérébral

*In vivo diffusion-weighted NMR spectroscopy to study brain  
lactate compartmentation*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 575, electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)  
Spécialité de doctorat : Physique et imagerie médicale  
Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes  
Réfèrent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Molecular Imaging Research Center  
(Université Paris-Saclay, CEA)**,  
sous la direction de **Julien Valette**, directeur de recherche

Thèse soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 18 décembre 2023, par

**Sophie MALAQUIN**

### Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

**Fawzi BOUMEZBEUR**

Directeur de recherche, Université Paris Saclay

Président

**Anne-Karine BOUZIER-SORE**

Directrice de recherche, Université de Bordeaux

Rapporteuse & Examinatrice

**Cristina CUDALBU**

Professeure, EPFL

Rapporteuse & Examinatrice

**Francesca BRANZOLI**

Chargée de recherche, Sorbonne Université

Examinatrice

**Titre :** Spectroscopie RMN *in vivo* pondérée en diffusion pour l'étude de la compartimentation du lactate cérébral

**Mots clés :** Lactate, spectroscopie RMN *in vivo*, diffusion, métabolisme, cerveau

**Résumé :** Dans la substance grise du cerveau, le lactate est un métabolite reconnu pour son rôle dans le fonctionnement cérébral. Le principal mécanisme proposé, la navette des astrocytes aux neurones, joue un rôle crucial dans le métabolisme cérébral et des dérèglements sont probablement impliqués dans la maladie d'Alzheimer. En l'absence d'outils non invasifs permettant de mesurer la compartimentation du lactate, ce mécanisme reste sujet à controverse. L'idée de cette thèse est que la spectroscopie RMN pondérée en diffusion pourrait permettre la mesure de la compartimentation du lactate de façon non-invasive : il est possible d'obtenir des informations sur les propriétés de diffusion induites par les différentes microstructures cellulaires, et, puisque le lactate est présent à la fois dans les astrocytes, les neurones, et le milieu extracellulaire, il suffirait donc

de mesurer ses propriétés de diffusion et de les comparer aux signatures spécifiques des diffusions intra-neuronales, intra-astrocytaires et extracellulaires, pour obtenir des informations sur sa compartimentation. L'objectif de la thèse est donc de mesurer de façon précise la diffusion du lactate en vue de déterminer sa compartimentation. Ces mesures ont été réalisées dans des modèles murins où un changement de compartimentation était suspecté, à savoir un modèle de réactivité astrocytaire, présentant des astrocytes hypertrophiés, et un modèle pathologique de la maladie d'Alzheimer. Ces résultats ont été confrontés à des mesures optiques et électrochimiques de référence permettant la mesure « directe » du lactate dans les différents compartiments.

**Title :** In vivo diffusion-weighted NMR spectroscopy to study brain lactate compartmentation

**Keywords :** lactate, *in vivo* NMR spectroscopy, diffusion, metabolism, brain

**Abstract :** In the gray matter of the brain, lactate is a metabolite known for its role in brain function and metabolism. The main proposed mechanism, the astrocyte-to-neuron shuttle, plays a crucial role in brain metabolism, and disruptions are likely involved in Alzheimer's disease. In the absence of non-invasive tools for measuring lactate compartmentalization, this mechanism remains a subject of controversy. The idea behind this thesis is that diffusion-weighted NMR spectroscopy could enable the non-invasive measurement of lactate compartmentalization: it is possible to obtain information about diffusion properties induced by different cellular microstructures, and since lactate is present in astrocytes, neurons, and the extracellular space, it would suffice to measure its diffusion properties and

compare them to the specific signatures of intraneuronal, intra-astrocytic, and extracellular diffusions to obtain information about its compartmentalization. These measurements were conducted in murine models where a change in compartmentalization was suspected, specifically an astrocytic reactivity model with hypertrophied astrocytes and a pathological model of Alzheimer's disease. These results were compared to reference optical and electrochemical measurements that allow for the 'direct' measurement of lactate in different compartments.

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à mon travail de thèse. Je remercie chaleureusement Anne-Karine Bouzier-Sore et Cristina Cudalbu d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse. Anne-Karine, encore merci pour ce très long mail explicatif du métabolisme cérébral, et très agréable à lire, et Cristina, encore merci pour les chocolats qui tombent à pic ! Je remercie également Francesca Branzoli ainsi que Fawzi Boumezbeur d'avoir accepté d'être examinateurs lors de la soutenance (et merci à Fawzi Boumezbeur d'avoir – encore- accepté d'être président du jury).

Merci également à Luisa Ciobanu et Fawzi Boumezbeur d'avoir suivi le déroulé de ma thèse de la commission d'admission au comité de suivi de thèse. Les discussions qui en ont résulté ont été très enrichissantes.

Malgré le COVID, ces quatre années de stage + thèse à MIRCen ont été extrêmement épanouissantes. J'ai trouvé très rapidement ma place au sein du laboratoire, et je pense que l'environnement enrichissant, et surtout les personnes qui m'ont entourée en sont la cause. Je ne suis pas forcément très douée pour mettre des mots sur ce que je ressens (je préfère m'exprimer par la pâtisserie, comme beaucoup ont pu en profiter le remarquer), mais je vais tacher de vous exprimer à tous et à toutes ma gratitude.

Je ne peux commencer ces remerciements par quelqu'un d'autre que Julien Valette. Un énorme merci pour m'avoir fait confiance en me donnant l'opportunité de participer à ce projet. Comme je le dis souvent à ma maman, je n'aurais pas pu avoir un meilleur directeur de thèse que toi. Tu as su me guider de façon admirable dans ce fascinant monde qu'est la spectro de diffusion, toujours avec bienveillance, mais sans hésiter à me remettre les idées en place lorsque c'était nécessaire. Malgré ton emploi du temps bien occupé (surtout ces derniers mois), tu as toujours pu te rendre disponible pour mes éventuelles suggestions, interrogations, doutes, corrections d'abstracts/chapitres. Merci de m'avoir soutenue pendant ces quatre ans, malgré les béquilles (cheville ou genou, j'aime faire dans la diversité), poignet tordu, doigts cassés, et autres joyeusetés qui sont devenues une habitude, et merci de continuer à me faire confiance avec le projet à San Francisco (on s'y attache, au lactate, même s'il fait toujours des trucs bizarres). Je pars loin, mais pas longtemps, et j'espère bien avoir encore l'occasion de travailler avec toi !

Merci également aux deux autres « adultes » de la team 4, Céline et Julien. Céline, merci pour ton aide tout au long de ma thèse, les ateliers tentative de sauvetage de câbles et soudure, les points organisation de thèse et galères de visa, et surtout nos nombreuses discussions pour refaire le monde de l'imagerie (la conclusion étant

souvent « il faut faire de l'éveillé »). Merci de m'avoir accordé du temps pour les répétitions de soutenance, et surtout de me donner l'opportunité de continuer à travailler sur le lactate, et en attendant que je revienne, garde foi en DIANA ! Julien F., merci pour tes conseils et ta gestion des caprices et pannes de l'IRM. Bon courage avec le CEST, et je compte bien m'entraîner pour te battre à la course à mon retour (sur Mario Kart bien sur, je sais bien qu'au niveau sportif je n'ai aucune chance) !

Je n'aurai pas pu avancer autant sur ce projet sans l'aide de la team expé animale ! Merci Martine pour ton aide inestimable à l'animalerie, tes conseils et tes formations malgré un emploi du temps chargé. Merci également à Julien Mitja pour les conseils sur la gestion de nos colonies. Mylène, merci de m'avoir appris certains gestes techniques, toujours un peu complexe et Marjorie, ta bonne humeur est tellement communicative et ta présence met des paillettes dans ma vie ! Gwen et Sueva, votre aide pendant les chirurgies a été capitale, merci.

Merci également à Lucile de nous avoir aidé pour la gestion de la colonie APP/PS1, ainsi que, dans un registre totalement différent, pour nos discussions à la cantine ; et à Marie-Claude pour son tutorat incroyablement clair sur la notion si complexe de génotypage. Noëlle, ma sauveuse du R+2, merci d'être venue à mon secours à chaque fois que j'errai comme un poussin perdu.

Merci aussi à vous qui êtes passés dans le bureau 110 tout au long de ma thèse. Déjà, merci à tous et toutes de m'avoir supporté, surtout pendant la période rédaction et préparation de soutenance. Mélissa, merci de m'avoir prise sous ton aile lorsque je suis arrivée en stage. Je n'y connaissais pas grand-chose, et malgré tout ce que tu avais à gérer en simultané, tu m'as aiguillée sur le chemin des mystères du lactate. Même à distance tu as pris des nouvelles des avancées (et reculées) de ma thèse, et j'espère avoir réussi à remplir un peu les chaussures que tu as laissées à la fin de ta thèse.

Merci Yohann et Jean-Baptiste pour votre bonne humeur. Yohann, ta capacité à voir des résultats dans du bruit m'a toujours impressionnée, et un jour je te battrai aux échecs. JB, ton enthousiasme et ta (souvent) bonne humeur manquent au bureau, et je suis très heureuse de continuer à te croiser, que ce soit en congrès ou autour d'une bière. Bon courage en Suisse !

Et Eloïse (avec un tréma sur le i sinon ça fait Et-loi-ze et c'est moche) j'aurais tellement de choses à dire ! Tu m'as tellement aidée tout au long de ma thèse sur tout et n'importe quoi que ton nom pourrait aussi figurer sur la couverture de ce manuscrit ! Merci pour ta patience et ta disponibilité pour toutes les questions plus ou moins pertinentes que j'ai pu avoir (et il y en a eu !), et d'avoir toujours répondu présente lorsque j'avais un souci à l'IRM. Je garde surtout en mémoire ces manipes où tu venais travailler à la console parce que j'avais besoin de soutien émotionnel ! Nos discussions allant de Harry Potter à la conception d'antennes IRM, en passant par les exercices de

kiné et le dernier Zelda (sans transition bien sûr) me manqueront beaucoup ! Tu es une personne formidable et je suis ravie d'avoir pu travailler avec toi !

Rodrigo, je sais que tu parles et comprends très bien le français maintenant alors merci pour ta bonne humeur, ton humour incroyable, et ta présence dans ce bureau ! Merci pour ton aide sur la partie un peu plus bio du projet. Nous nous sommes mutuellement supportés émotionnellement devant toutes les « Psycho » qui se sont succédées. Malgré toutes les déconvenues que tu as rencontrées, tu as toujours gardé un optimisme débordant, et j'en suis admirative. Merci également pour ta fibre artistique (qui ferait presque concurrence à la mienne ;) ) qui égaie le bureau. Ça a été un vrai plaisir de passer ces 4 ans à tes côtés, et j'espère que nous ne perdrons pas contact !

Maëliiss, j'ai été ravie d'avoir fait un bout de chemin avec toi, ces quelques semaines disséminées tout au long de l'année ont été fort agréables (souvent plus pour moi que pour toi). Je garde toujours précieusement ton cœur, et j'espère que tu continueras à chantonner les différentes versions de « petit escargot » en pensant à moi ;)

Cécile et Cameron, ne vous entretenez pas pendant mon absence ! Merci Cécile de m'avoir rejoint plus tôt à Toronto, c'était bien plus drôle ! Bon courage avec la fin de ta thèse, mais tu as déjà abattu un travail faramineux alors garde foi ! Cameron, essaie de ne rien casser de plus, et je te détruis aux échecs quand tu veux ! Monica, merci pour toutes tes questions qui m'ont bien préparé pour ma soutenance. Aie confiance en toi, je sais que tu vas bien t'en sortir !

Amélie, ma co-thésarde/co-bureau ! Merci pour ton soutien, et nos pétages de câble de plus en plus fréquents sur la dernière année (le tableau du bureau en garde trace). Bon courage avec ta formation, mais je sais que tu vas gérer la fougère ! Et sans oublier le reste de la promo « j'ai-commencé-ma-thèse-avec-le-covid-c'était-fun », Pauline et Mathilde. Je vous admire toutes les trois pour votre capacité à courir le midi entre deux manipes. Pauline, bon déménagement en Suisse, et bonne dégustations de chocolats ! Mathilde, bon courage pour la 4<sup>ème</sup> année, tu nous feras une soutenance incroyable j'en suis sûre !

Merci également aux doctorants et postdoctorants de MIRCen, présents ou passés pour les soirées PMU ou au bord du lac, Asma, Audrey, Bradel, Cécile, Charlotte, Chloé, Déborah, Emma, Gaëtan, Karouna, Léo, Lilian, Lolie, Lucile, Lucille, Milena, Miriam, Nathan, PA, Tom... Je suis sûre que j'en oublie, ne m'en voulez pas !

Pour finir, je suis extrêmement reconnaissante du soutien infailible de mes proches et amis. Merci en particulier à Maylis, qui me suis depuis bien longtemps sans flancher et avec qui j'espère je continuerai à partager ces grands moments encore longtemps ; et Alice, depuis moins longtemps mais toujours aussi présente. Capucine et Clémence, le triumvirat de choc, merci de m'avoir toujours encouragée et d'avoir été là pour me

remonter le moral (et pour me taper sur les doigts lorsque je faisais passer ma santé au dernier plan). J'ai hâte d'assister à vos futurs grands évènements !! Agathe, pour ta présence et ton soutien depuis la PACES, et merci d'être une oreille attentive et enthousiaste quand il s'agit de discuter poney. Karen, thanks for rooting for me all the way from Mexico. Merci également à Erwan, d'avoir supporté mes humeurs changeantes tout au long de ma thèse. Camille, il faut absolument que je vienne te voir à Nice. Merci pour ton soutien au quotidien malgré la distance, et pour tes conseils avisés sur la gestion de mon emploi du temps (me rappeler de manger et dormir par exemple).

A mon PETIT frère (malgré notre différence de taille, tu resteras toujours mon petit frère chéri), Timothée, je ne sais pas trop si je dois te remercier de quoi que ce soit... Je plaisante bien sûr, si j'ai dû te supporter toutes ces années, la réciproque est vraie, et ce n'était pas toujours chose aisée. Garde ton optimisme et ton humour (même s'il pourrait être un peu moins douteux), et j'ai confiance en toi et tes capacités pour ton futur !

Et à mes parents bien sûr, sans qui rien n'aurait pu se faire. Merci d'avoir toujours cru en moi, même lorsque je n'y croyais pas moi-même. L'éducation que vous m'avez donnée, et la force avec laquelle vous m'avez poussée tout au long de ma vie ont formé la personne que je suis maintenant. Alors certes, ce n'est pas le doctorat avec lequel je vous martelais la tête toute petite, mais je pense bien avoir trouvé la voie dans laquelle je suis la plus épanouie, et vous avez une grande part de responsabilité là dedans. Alors encore une fois, et ce ne sera jamais suffisant, merci !

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans évoquer ceux qui partagent ma vie au quotidien, comme une petite patate (qui a pris de l'embompoint) qui m'a bien soutenue émotionnellement parlant surtout pendant la rédaction (figure 1). Et bien sûr, il n'y a pas de terme assez puissant pour exprimer l'ampleur de ma gratitude et reconnaissance envers Ronan. Je n'ai pas toujours été la plus facile à vivre, alors merci pour ton soutien sans faille, ton adaptabilité, ta patience, ton aide sur les formules les plus physiques de ce manuscrit, nos thèses respectives furent de belles aventures partagées ensemble, et j'espère les premières d'une longue liste d'encore plus belles.

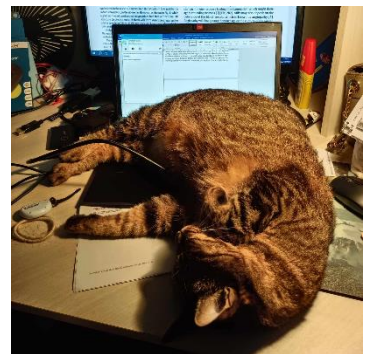


figure 1 : illustration du soutien émotionnel de Patata, chat de son état, pendant la rédaction du manuscrit

# TABLE DES MATIERES

---

<b>Abréviations et notations.....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>14</b>
<b>Partie 1 : Le métabolisme cérébral, la RMN, et la pondération en diffusion.....</b>	<b>16</b>
1. Compartimentation cellulaire du métabolisme cérébral.....	16
1.1. Des cellules du système nerveux central.....	16
1.2. ... aux métabolites intracellulaires et leur compartimentation.....	21
1.3. Métabolisme énergétique.....	27
1.4. Mécanisme de la navette lactate et compartimentation du lactate.....	34
2. Histoire et principes de la Résonance Magnétique Nucléaire.....	38
2.1. Description semi-classique du signal RMN.....	38
2.2. ... et sa description quantique.....	42
2.3. Déplacement chimique pour distinguer des molécules en RMN.....	44
2.4. Les impulsions RF et adiabatiques.....	45
2.5. Couplage J.....	48
2.6. La localisation du voxel en spectroscopie.....	51
3. Le phénomène de diffusion et sa mesure par RMN.....	54
3.1. La diffusion libre.....	54
3.2. Diffusion restreinte et tortueuse.....	56
3.3. La pondération en diffusion et les gradients de diffusion.....	57
3.4. La diffusion comme biomarqueur de la morphologie cellulaire.....	60
3.5. Le Q-space, les hautes valeurs de b, et la sensibilité à la restriction.....	63
3.6. Double Encodage en Diffusion (DDE).....	66
<b>Partie 2 : En pratique.....</b>	<b>69</b>
4. Méthodes expérimentales.....	69
4.1. Set-up et protocole expérimental.....	69
4.2. S'affranchir de l'anisotropie et des dérives temporelles.....	73
4.3. Traitement des données.....	75



5.	Différentes séquences pour différentes acquisitions .....	81
5.1.	Mesures aux hautes valeurs de $b$ , ou simple encodage en diffusion (SDE) .....	81
5.2.	Double encodage en diffusion.....	89
5.3.	La suppression optimisée de l'eau avec le module VAPOR .....	91
6.	Modélisation et Mesures de référence .....	93
6.1.	Modélisation de la microstructure .....	93
6.2.	Les mesures électro-optiques et chimiques de référence .....	104
	Publications associées.....	109

### **Partie 3 : Application à des modèles rongeurs pathologiques ..... 110**

7.	Modèle d'activation astrocytaire .....	110
7.1.	Le gène CNTF responsable de l'activation astrocytaire .....	110
7.2.	Protocole expérimental.....	113
7.3.	Etude des métabolites intracellulaires .....	114
7.4.	Une quantification du lactate compromise .....	119
7.5.	Discussion.....	123
8.	Modèle de la maladie d'Alzheimer : le modèle APP/PS1dE .....	124
8.1.	La maladie d'Alzheimer .....	124
8.2.	Le modèle APP/PS1dE9.....	126
8.3.	Mesures préliminaires.....	127
8.4.	Mesures de diffusion à 12 mois avec la SE-LASER polychromatique.....	134
8.5.	Mesures de diffusion à 18 mois avec la SE-LASER LSB .....	137
8.6.	Mesures en DDE.....	141
8.7.	Mesures électro-optiques et chimiques de référence .....	144
8.8.	Discussion.....	147
	Publications associées.....	149

### **Discussion et conclusion générale ..... 150**

### **Bibliographie..... 153**

### **Annexe ..... 175**



## ABREVIATIONS ET NOTATIONS

---

AAV	Virus Adéno-Associé
ADC	Coefficient de Diffusion Apparent
ADP	Adénosine Biphosphate
AFP	Adiabatic Full Passage
AHP	Adiabatic Half Passage
ANLS	Astrocyte to Neuron Lactate Shuttle – Navette lactate des astrocytes aux neurones
APP	Amyloid precursor protein
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
A $\beta$	Protéine bêta-amyloïde
b	Pondération en diffusion
B <sub>0</sub>	Champ magnétique statique
B <sub>1</sub>	Champ magnétique oscillant
B <sub>eff</sub>	Champ magnétique effectif
CHES	CHEmical shift Selective Suppression
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor – Facteur neurotrophique ciliaire
D	Coefficient de diffusion libre théorique
DDE	Double Encodage en Diffusion
D <sub>extra</sub>	Coefficient de diffusion extracellulaire
D <sub>free</sub>	Coefficient de diffusion libre
D <sub>intra</sub>	Coefficient de diffusion intracellulaire
DTI	Diffusion Tensor Imaging

DWV	Double Wave Vector
d-PFG	Double Pulse Field Gradient
FADH <sub>2</sub>	DiHydrure de Flavine Adénine Dinucléotide
f <sub>astro</sub>	fraction de lactate astrocytaire
f <sub>extra</sub>	fraction de lactate extracellulaire
f <sub>neuron</sub>	fraction de lactate neuronal
FRET	Förster Resonance Energy Transfer – Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
G	Intensité du gradient
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein – Protéine acide fibrillaire gliale
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Ins	Myo-inositol
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
Lac	Lactate
LACZ	Gène codant pour la $\beta$ -galactosidase
LASER	Localisation by Adiabatic SElective Refocusing
LSB	Long Single Band
LDH	Lactate Déshydrogénase
LOD	Lactate Oxydase
MCT	Transporteur MonoCarboxylate
MM	Macromolécules
NAA	N-acétylaspartate

NAAG	N-acétyl-L-aspartate-L-glutamate
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Hydruure de Nicotinamide Adénine Dinucléotide
PBS	Phosphate Buffered Saline - Tampon phosphate salin
PC	Polychromatique
PGSE	Pulse Gradient Spin Echo
RF	RadioFréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
$r_{\text{soma}}$	rayon des corps cellulaires
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – Transcription Inverse Reaction en Chaîne par Polymérase
SDE	Simple Encodage en Diffusion
SE	Echo de spin
SNC	Système Nerveux Central
SNR	Rapport Signal sur Bruit
STE	Echo stimulé
Tau	Taurine
tCho	Composés cholinergiques
tCr	Créatine totale
$t_d$	Temps de diffusion
TE	Temps d'écho
TI	Temps d'inversion
TM	Temps de Mélange
TMS	TetraMéthylSilane

TR	Temps de répétition
VAPOR	Variable Pulse power and Optimized Relaxation delays
WT	Wild Type
$\Delta$	Durée entre deux gradients de diffusion
$\delta$	Durée d'un gradient de diffusion
$\gamma$	rapport gyromagnétique de l'atome
$\mu$	moment magnétique intrinsèque
$\omega$	Fréquence de l'impulsion radiofréquence
$\omega_0$	Fréquence de Larmor

## INTRODUCTION GENERALE

---

Les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson... ou autres maladies neurodégénératives sont tristement connues à travers le monde. Avec le vieillissement de la population, leur incidence est en constante augmentation, ce qui en fait un véritable problème de santé publique. En conditions pathologiques, le cerveau subit des altérations structurelles et métaboliques importantes, et leur étude permettrait de déterminer des biomarqueurs de la progression de la maladie, indispensables pour le développement de thérapie.

Dans le cerveau, et plus particulièrement la substance grise, le lactate est un métabolite désormais reconnu pour son rôle dans le fonctionnement cérébral. Ses mécanismes sous-jacents restent cependant mal compris. Le principal mécanisme proposé, la navette lactate des astrocytes aux neurones (Pellerin et al., 1994), joue vraisemblablement un rôle crucial dans le métabolisme cérébral, et des dérèglements de cette navette sont probablement impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, ce mécanisme reste sujet à controverse, en l'absence d'outils permettant de mesurer la compartimentation du lactate de manière non-invasive. En effet, à ce jour, les méthodes employées pour l'analyse des tissus sont extrêmement invasives (biopsies, coupe de cerveau...) et les méthodes d'imagerie non-invasives classiques ne permettent pas d'obtenir de manière directe d'information à l'échelle cellulaire, puisque leur résolution spatiale, de l'ordre du millimètre, est bien trop basse.

L'idée sous-tendant cette thèse est que la spectroscopie RMN pondérée en diffusion pourrait permettre de mesurer la compartimentation du lactate de manière non invasive. En effet, la spectroscopie RMN pondérée en diffusion permet de mesurer les propriétés de diffusion des métabolites dans le cerveau, et ainsi d'en extraire des informations à propos de l'environnement microstructural dans lequel ils diffusent (Palombo et al. 2018). Notre équipe a montré au cours de ces dernières années que certains paramètres morphologiques cellulaires tels que diamètre et longueur des fibres des principaux types cellulaires du cerveau, pouvaient être extraits en modélisant les données de diffusion, et qu'il était possible de mesurer des variations de ces paramètres dans un contexte pathologique. Ainsi, il est possible d'obtenir des informations sur les propriétés de diffusion induites par les différentes microstructures cellulaires, et, puisque le lactate est présent à la fois dans les astrocytes, les neurones, et le milieu extracellulaire, il suffirait donc de mesurer ses propriétés de diffusion et de

les comparer aux signatures spécifiques des diffusions intra-neuronales, intra-astrocytaires et extracellulaires, pour obtenir des informations sur sa compartimentation.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse de Clémence Ligneul (2017) sur le développement d'outils de spectroscopie RMN du proton pondérée en diffusion pour l'exploration non invasive de la structure intracellulaire du cerveau de souris, et de Mélissa Vincent (2021), qui s'est notamment concentrée sur l'exploration de l'espace extracellulaire.

L'objectif de la thèse est donc d'adapter ces méthodes afin de mesurer de façon précise la diffusion du lactate en vue de déterminer sa compartimentation (partie 2, chapitres 4 à 6). Ces mesures ont été réalisées dans des modèles murins où un changement de compartimentation était suspecté, à savoir un modèle de réactivité astrocytaire, présentant des astrocytes hypertrophiés et préalablement étudié par Clémence Ligneul (chapitre 7), et un modèle pathologique de la maladie d'Alzheimer (chapitre 8). Ces résultats ont été confrontés à des mesures optiques et électrochimiques de référence permettant la mesure « directe » du lactate dans les différents compartiments.



## **PARTIE 1 : LE METABOLISME CEREBRAL, LA RMN, ET LA PONDERATION EN DIFFUSION.**

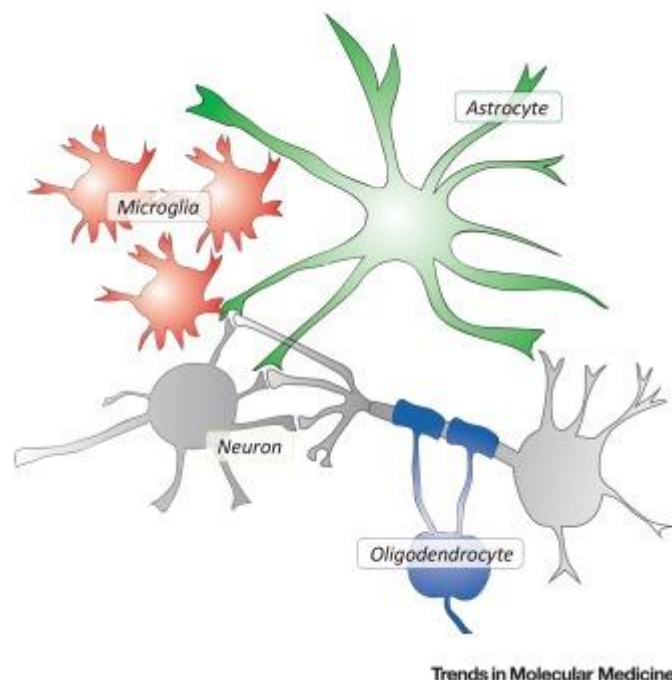
---

### **1. COMPARTIMENTATION CELLULAIRE DU METABOLISME CEREBRAL**

Dans ce chapitre, nous évoquerons l'architecture cérébrale et les différents métabolites impliqués dans le fonctionnement et le métabolisme cérébral, ainsi que le métabolisme énergétique cérébral à proprement parler. Ces explications sont simplifiées, mais nécessaires pour appréhender l'intérêt des mesures *in vivo* effectuées lors de ce travail de thèse.

#### **1.1. Des cellules du système nerveux central...**

Le système nerveux central (SNC) est constitué du cerveau et de la moelle épinière. Comme son nom l'indique, il contient la majorité du système nerveux et est au centre du traitement et de la transmission de l'information. Il se compose de deux



**figure 1-1** : Illustration des cellules fondamentales du cerveau : les neurones (gris), et les cellules gliales regroupant les astrocytes (vert), la microglie (rouge), et les oligodendrocytes (bleu). Tiré de Carter et al., 2019.

grands types cellulaires : les neurones, comptant pour 10% des cellules cérébrales, bien qu'occupant plus de 60% du volume cérébral (Chklovskii et al., 2002), et les cellules gliales, représentant environ 90% des cellules cérébrales (Herculano-Houzel, 2014), mais occupant uniquement 20 à 25% du volume cérébral (Hertz, 2008).

Au sein du SNC, on peut également différencier la substance blanche, composée en grande partie d'axones et d'oligodendrocytes la rendant fortement anisotrope, de la substance grise, dont le volume est majoritairement occupé par les corps cellulaires des neurones, et que l'on peut considérer comme isotrope.

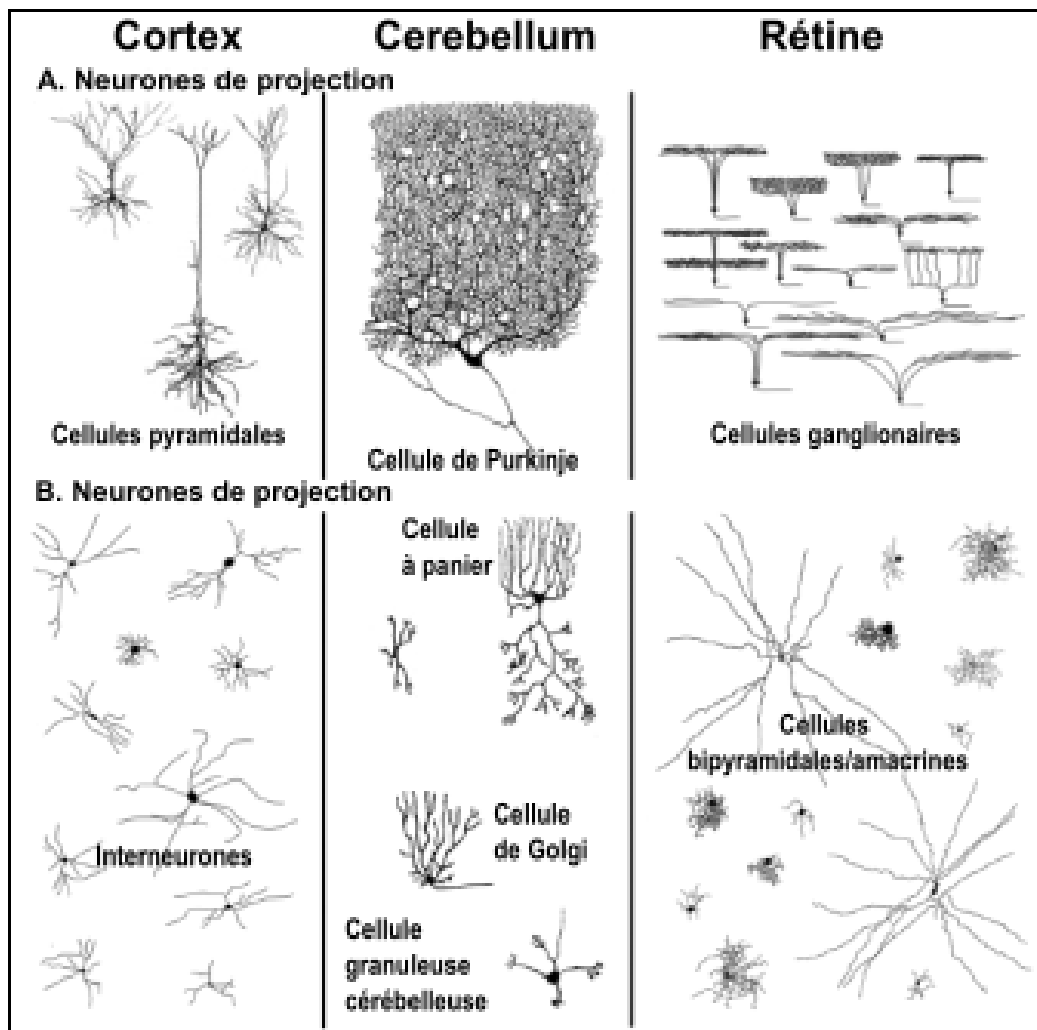
### 1.1.1. *Les neurones*

Les neurones sont les cellules du cerveau qui permettent la transmission d'informations (Foster et al., 1897). Il existe différents types de neurones de taille et de forme variées, comme illustré figure 1-2, mais leur structure principale reste similaire :

- Un corps cellulaire, ou soma, dont le diamètre varie de 5 à 60  $\mu\text{m}$  (Alexander et al., 2019). Il est assez semblable au corps d'autres cellules, en étant composé du noyau, du cytoplasme, et du cytosquelette. Du soma partent de fines branches, appelées dendrites et axones
- Un axone, dont le diamètre est compris entre 0,1 et 10  $\mu\text{m}$  et dont la longueur varie en fonction du type de neurone. On trouvera plus souvent des neurones aux axones courts (<3 mm) dans le cortex, plus long dans la substance blanche superficielle, et très longs (>30 mm) dans la substance blanche profonde (faisceaux de fibres). Il transmet l'information électrique sortant du neurone. On les trouve souvent entourés d'une gaine de myéline, favorisant la vitesse de propagation de l'information (sous forme de potentiels d'action, c'est-à-dire d'un signal électrique correspondant à une dépolarisation transitoire de la membrane se propageant de manière unidirectionnelle).
- Des dendrites, qui sont des ramifications du corps cellulaire. Elles peuvent présenter des excroissances appelées épines dendritiques, et leur organisation spatiale varie d'une région à une autre. Ces dernières vont recapturer une partie des neurotransmetteurs transmis par le neurone présynaptique, ce qui aura pour effet de modifier le potentiel transmembranaire du neurone post-

synaptique et de transmettre de nouveau une information sous forme de signal électrique.

- Les synapses, qui se situent à la terminaison de l'axone. En réponse aux signaux électriques transmis par les axones aux épines dendritiques, elles vont libérer des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, convertissant ainsi le signal électrique en signal chimique.



**figure 1-2 :** Illustrations dessinées par Cajal représentant les différents types de neurones que l'on peut trouver dans le cerveau de mammifères (Masland, 2004).

Dans un contexte pathologique, la morphologie et le fonctionnement neuronal sont susceptibles d'être modifiés. Il a été montré que dans le cas de maladies neurodégénératives, la production ou synthèse de certaines protéines devient anormale, perturbant le fonctionnement neuronal (Vaquer-Alicea & Diamond, 2019). Pour la maladie d'Alzheimer, par exemple, la protéine Tau anormalement

phosphorylée provoque entre autres une dégénérescence neuronale (Ashrafian et al., 2021).

### 1.1.2. *Les cellules gliales*

Les cellules gliales du système nerveux central regroupent principalement trois types cellulaires : les oligodendrocytes, la microglie, et les astrocytes, qui représentent à eux seuls 20 à 40 % des cellules cérébrales, en faisant le type cellulaire le plus abondant dans le SNC (Herculano-Houzel, 2014). Du fait de leur taille, les astrocytes occupent également plus de la moitié du volume glial cérébral (Wolff & Chao, 2003).

#### *Oligodendrocytes*

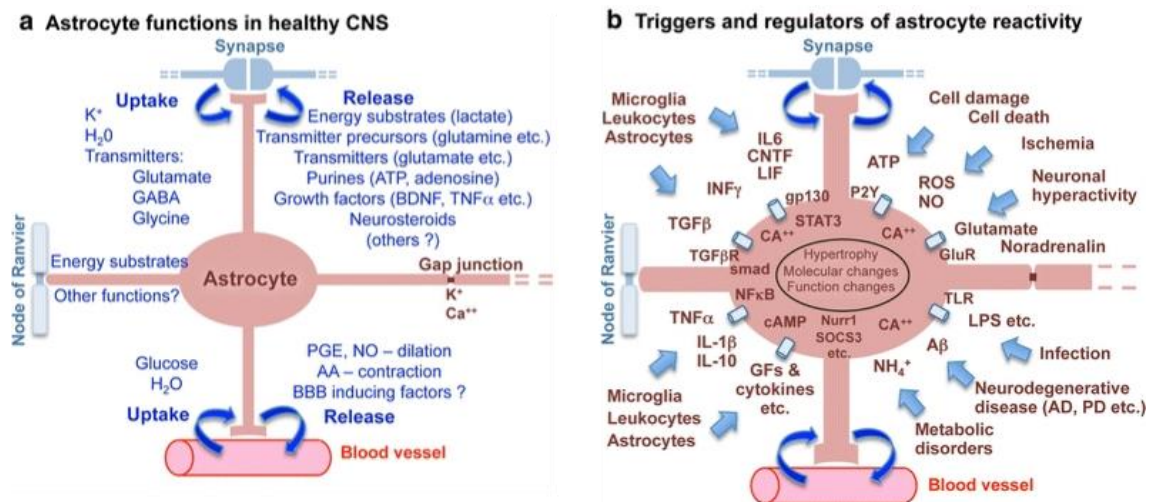
Les oligodendrocytes (Carter et al., 2019) sont majoritairement présents dans la substance blanche du SNC. Ils forment une gaine de myéline autour de certains axones, accélérant ainsi la transmission des signaux électriques le long des axones.

#### *Microglie*

Bien que ne représentant que 10% des cellules gliales et ayant une fraction volumique minime (Wolff & Chao, 2003), la microglie joue un rôle important au niveau des défenses immunitaires du SNC. Les cellules sont assez similaires aux macrophages présents dans le reste du corps. Très petites, elles s'activent en réponse à une inflammation, et vont proliférer, se déplacer jusqu'à la zone infectée et/ou blessée, et à terme avoir une action soit phagocytaire, soit de nettoyage de débris et cellules mortes (Graeber & Streit, 1990).

#### *Astrocytes*

Les astrocytes présentent un corps cellulaire au diamètre relativement important (de l'ordre de 4µm chez la souris), entouré de prolongements lui conférant sa forme d'étoile (Oberheim et al., 2006). Ces prolongements permettent des contacts étendus avec des vaisseaux sanguins (Sofroniew & Vinters, 2010).

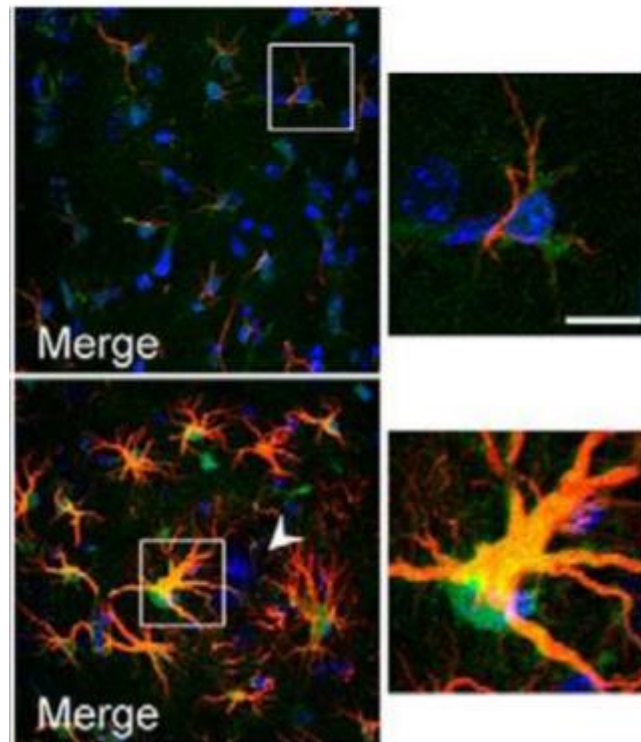


**figure 1-3** : Schéma résumant A. les fonctions astrocytaires dans le SNC sain et B. les amorces et régulateurs moléculaires de la réactivité astrocytaire. Tiré de Sofroniew & Vinters, 2010

Ils contrôlent les niveaux de neurotransmetteurs synaptiques et maintiennent une homéostasie ionique autour des neurones, en particulier via la recapture de glutamate, un neurotransmetteur (cf chapitre 1.2.), pour limiter l'écitotoxicité. Ils permettent ainsi une transduction du signal au niveau de la synapse très efficace, et vont également libérer des gliotransmetteurs dans la fente synaptique pour renforcer ce signal (Carter et al., 2019). La figure 1-3-A illustre les rôles et fonctions des astrocytes dans un milieu sain. Un de ces rôles principaux est la libération de lactate dans l'espace extracellulaire pour qu'il soit consommé par les neurones en tant que substrat énergétique. Ce mécanisme sera détaillé ultérieurement, chapitre 1.4.

Dans certains cas de maladies neurodégénératives, on constatera une réactivité astrocytaire. Il s'agit du procédé par lequel les astrocytes subissent des modifications dans la régulation transcriptionnelle, et le remodelage métabolique, biochimique, et physiologique (Escartin et al., 2021), en réponse à des évènements anormaux dans le SNC. Ce phénomène est illustré figure 1-3-B. Les astrocytes réactifs sont facilement identifiables grâce à leur hypertrophie (figure 1-4).

Nous verrons chapitre 8 que cette réactivité peut également être induite par transfert et surexpression d'un gène, comme le CNTF par exemple (Ligneul et al., 2019).



**figure 1-4 :** Astrocytes réactifs (en bas) dans un modèle souris de la maladie d'Alzheimer (3xTg-AD, 12 mois), comparés aux astrocytes chez la souris contrôle (en haut). Marquage STAT3 (vert), GFAP (rouge), et DAPI (bleu). Tiré de Ben Haim et al., 2015.

## 1.2.... aux métabolites intracellulaires et leur compartimentation

Dans cette section, nous évoquerons uniquement les principaux métabolites, visibles en RMN du fait de leur concentration. Un résumé de leurs différentes compartimentations ainsi que leurs concentrations en fonction de la région du cerveau de souris observée est proposé table 1.

### 1.2.1. *Les marqueurs neuronaux*

#### *N-acétylaspartate (NAA)*

Le N-acétylaspartate est un métabolite spécifique du système nerveux et est synthétisé à partir de L-aspartate et d'acétyl-CoA par la L-aspartate N-acétyl transférase, une enzyme présente dans les mitochondries (Ariyannur et al., 2008). Il a

également été démontré que le NAA est aussi produit par clivage enzymatique du neurotransmetteur N-acétyl-L-aspartate-L-glutamate, ou NAAG (Robinson et al., 1987).

Les niveaux de concentration du NAA dans diverses régions du cerveau sont de l'ordre du millimolaire, et peuvent atteindre jusqu'à 10 mM en fonction de la région cérébrale (Moffett et al., 2007). Il s'agit de la molécule la plus abondante dans le cerveau après le glutamate.

La spectroscopie RMN sur des cultures cellulaires in vitro de neurones et de cellules gliales a montré une présence de NAA majoritairement dans les neurones (Griffin et al., 2002; Urenjak et al., 1992). Il a également été montré qu'il est concentré principalement dans les neurones aux axones longs ou aux arborescence denses (Simmons et al., 1991). Une diminution de concentration du NAA a souvent pu être observée dans les cas de maladies neurodégénératives impliquant une perte neuronale (Choi et al., 2007; Jenkins et al., 2000).

L'intensité de son signal en spectroscopie RMN en a fait l'un des biomarqueurs les plus fiables, et sa spécificité aux neurones un marqueur du compartiment neuronal idéal.

### *Glutamate (Glu)*

Le glutamate est formé dans les mitochondries des neurones à partir de glutamine par l'enzyme glutaminase (Bak et al., 2006). Il peut également être synthétisé en suivant la transamination de l'alpha-cétoglutarate (de Graaf et al., 2011).

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus abondant dans le SNC (Ramadan et al., 2013). Il est déversé par exocytose dans la fente synaptique via les vésicules des neurones glutamatergiques, sous l'effet d'un potentiel d'action. Il est ensuite capté par les récepteurs post-synaptiques afin d'activer la propagation du potentiel d'action. L'excès de glutamate sera recapturé par les cellules gliales voisines pour y être métabolisé en glutamine. Cette dernière sera ensuite retransportée vers les neurones pour une reconversion en glutamate (Okumoto et al., 2005; Pellerin & Magistretti, 1994). Le glutamate est également le précurseur métabolique de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, ou GABA, qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le SNC (Roberts & Frankel, 1950). Bien que présent également dans la fente synaptique, il est majoritairement concentré dans les neurones et le signal détectable en RMN est donc principalement intra neuronal (Griffin et al., 2002).

Enfin, biochimiquement, le glutamate joue un rôle central dans de nombreuses pathologies, incluant la perception de la douleur (Goudet et al., 2009), des troubles psychiatriques (Brennan et al., 2010; Mason & Krystal, 2006), ou encore certaines maladies neurodégénératives (Scott et al., 2011).

### 1.2.2. *Les marqueurs gliaux*

#### *Myo-Inositol (Ins)*

Le *myo*-Inositol provient principalement de l'alimentation, et est également produit à partir de la synthèse du glucose-6-phosphate (Eisenberg & Parthasarathy, 1987). Il a été isolé pour la première fois à partir du muscle en 1850 par Johannes Joseph Scherer. Il est connu pour jouer un rôle dans l'osmorégulation et l'homéostasie du calcium (Isaacks et al., 1994) ainsi dans le maintien de la structure de la membrane cellulaire et de la myéline (Toker & Cantley, 1997). Avec sa structure proche de celle du glucose, il joue également un rôle de signalisation, notamment sur l'absorption de glucose. Dans le cerveau humain, il a également été montré que les concentrations absolues d'inositol varient avec le temps : dans le cortex temporal, par exemple, sa concentration diminue de plus de 50% de 20 à 90 ans (Stokes et al., 1983).

C'est un métabolite présent principalement dans les cellules gliales (Brand et al., 1993), même si on peut le retrouver en faibles quantités dans les neurones : la concentration de *myo*-inositol dans ces derniers est en moyenne inférieure à 4 mM, tandis qu'elle est comprise entre 12 et 15 mM dans les astrocytes, faisant de l'inositol un métabolite trois fois plus concentré dans les astrocytes que dans les neurones (Fisher et al., 2002), et ainsi un très bon biomarqueur de l'espace intra-astrocytaire.

#### *Glutamine (Gln)*

La glutamine est un métabolite compartimenté dans les cellules gliales et, comme évoqué précédemment, fortement connecté à la production de glutamate. Elle est synthétisée majoritairement à partir du glutamate synthétisé via l'alpha-cétoglutarate astrocytaire ou libéré dans la fente synaptique par la glutamine synthase, et, dans une plus faible mesure, à partir de GABA (Bak et al., 2006). Sa compartimentation astrocytaire est justifiée par la présence de glutamine synthétase, enzyme permettant sa synthèse, uniquement dans l'astrocyte (Martinez-Hernandez et al., 1977).



Outre son rôle essentiel pour la synthèse de protéine, elle intervient dans le cadre du cycle glutamate/glutamine, qui consiste en la détoxification de l'espace cellulaire par la recapture et synthèse en glutamine du glutamate libéré dans la fente synaptique (Ramadan et al., 2013).

### *Composés cholinergiques (tCho)*

Les composés cholinergiques, à savoir la choline (Cho), la phosphocholine (pCho), la glycérophosphocholine (GPC) et la phosphatidylcholine, jouent un rôle complexe dans le corps (Tayebati & Amenta, 2013). En spectroscopie RMN, on exclut la phosphatidylcholine de la choline totale puisqu'elle est indétectable du fait de son temps de relaxation transversal court. De plus, la choline pure est très faiblement présente dans le cerveau. Ainsi, le pic observé en RMN est constitué presque exclusivement de GPC et de pCho.

La choline est nécessaire pour la synthèse d'acétylcholine, un neurotransmetteur (Tayebati & Amenta, 2013). Elle joue également un rôle important dans le développement de la mémoire et plus généralement du cerveau chez le fœtus et l'enfant (Krigman & Hogan, 1976; Shaw et al., 2004).

Elle est nécessaire pour la synthèse des phospholipides (pCho, et GPC), qui sont des composants essentiels des membranes cellulaires (Jagannathan et al., 1996).

Les composés cholinergiques sont réputés être principalement compartimentés dans les astrocytes (Urenjak et al., 1993), et certains travaux ont même montré que leur concentration est jusqu'à dix fois plus importante dans les astrocytes que dans les neurones (Belle et al., 2002).

### 1.2.3. *Les marqueurs non spécifiques*

#### *Créatine et phosphocréatine (tCr)*

La créatine est le composant principal de la phosphocréatine, qui permet la formation d'ATP à partir d'ADP. Bien que considérée pendant longtemps comme un marqueur glial, il a été démontré *in vitro* que la créatine et la phosphocréatine sont autant présentes dans les neurones que dans les astrocytes (Griffin et al., 2002; Urenjak et al., 1993). En spectroscopie RMN du proton, il est difficile de distinguer la phosphocréatine de la créatine, c'est pourquoi, de manière générale, on parlera de créatine totale (tCr).

Sa concentration relativement stable, hormis dans certain cas pathologiques de gliose (Suhy et al., 2000; Urenjak et al., 1993), en fait une référence en terme de ratios de concentrations par rapport aux autres métabolites cérébraux.

### *Taurine (Tau)*

La taurine est un des seuls acides aminés non utilisés pour la synthèse de protéine. Elle est peu produite par l'organisme, ainsi, son apport se fait principalement via l'alimentation (Ripps & Shen, 2012). On la retrouve principalement dans les astrocytes, mais c'est un métabolite présent dans l'ensemble du système nerveux central.

Longtemps considérée comme non essentielle, il a depuis été démontré qu'elle joue un rôle primordial dans l'osmorégulation (Taylor et al., 1995), dans la régulation de l'excitotoxicité (Sun & Xu, 2008) et dans le développement cellulaire (Sturman & Gaull, 1975; Sturman & Hayes, 1980). Du fait de son rôle cytoprotecteur, la taurine présente également une activité antiépileptique, démontrée chez le rat (Izumi et al., 1973), la souris (Carruthers-Jones & van Gelder, 1978), le chat (van Gelder et al., 1977), et le chien (Hayashi, 1959). Enfin, une carence en taurine induirait un retard dans la différenciation cellulaire et le développement cérébral (Hernández-Benítez et al., 2010).

### *Les macromolécules (MM)*

Les macromolécules sont des protéines, grosses molécules composées d'acides aminés, et présentes dans toutes les cellules du cerveau. Certains des acides aminés les composant contribuent au spectre RMN de façon non négligeable (Marjańska & Terpstra, 2021), se superposant aux résonances des métabolites. Pour obtenir une quantification fiable, il faut donc impérativement pouvoir distinguer le spectre des métabolites du spectre des macromolécules, ce qui est possible grâce au temps de relaxation de ces dernières, très court comparé à celui des métabolites, en raison de la plus petite taille de ces derniers. Ce point sera explicité plus en détails chapitre 4.

Métabolite	Concentration (mmol/kg)	Références	Région	Compartimentation	Références
NAA	8,7 – 9,7	(Kulak et al., 2010)	Cortex	Neurones	(Griffin et al., 2002; Urenjak et al., 1992)
	5,8 – 6,5	(Duarte et al., 2014)	Striatum		
	6,5 – 7,0		Hc		
NAAG	0,6 – 0,9	(Kulak et al., 2010)	Cortex	Neurones	
	0,5 – 0,7	(Duarte et al., 2014)	Striatum/Hc		
Glutamate	8,8 – 12	(Kulak et al., 2010)	Cortex	Neurones	
	6,4 – 7,8	(Duarte et al., 2014)	Striatum		
	7,4 – 8,6		Hc		
Myo- inositol	4,2 – 4,8	(Kulak et al., 2010)	Cortex	Astrocytes	(Choi et al., 2007; Fisher et al., 2002)
	4,1 – 4,3	(Duarte et al., 2014)	Striatum		
	5,0 – 5,3		Hc		
Glutamine	2,6 – 3,9	(Duarte et al., 2014)	Cortex/Hc	Astrocytes	(Ramadan et al., 2013)
	3,0 – 3,2		Striatum		
Choline totale	0,9 – 1,1	(Duarte et al., 2014)	Cortex/Hc	Astrocytes	(Belle et al., 2002; Urenjak et al., 1993)
	1,3 – 1,5		Striatum		
Créatine totale	7,2 – 7,7	(Duarte et al., 2014)	Cortex/ Striatum	Neurones, astrocytes	(Griffin et al., 2002; Urenjak et al., 1993)
	7,6 – 8,1		Hc		
Taurine	8,9 – 11	(Kulak et al., 2010)	Cortex	Neurones, astrocytes	(Ripps & Shen, 2012)
	12 – 14	(Duarte et al., 2014)	Striatum		
	9,3 – 9,6		Hc		
Lactate	1,4 – 2	(Kulak et al., 2010)	Cortex	Neurones, astrocytes, espace extracellulaire	(Mächler et al., 2016; Pellerin & Magistretti, 2012.)
	2,5 – 3,5	(Duarte et al., 2014)	Striatum		
	1,7 – 2,5		Hc		

**Table 1-1** : Concentration et compartimentation des métabolites dans la littérature dans les cortex, striatum, et hippocampe (hc) du cerveau de souris adulte.

### 1.3. Métabolisme énergétique

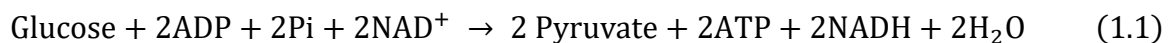
Le cerveau humain constitue seulement 2% de la masse corporelle mais utilise 20% de l'oxygène total (Rolfe & Brown, 1997) et 25% du glucose total au repos (Pellerin, 2005).

Cette utilisation massive est nécessaire et indispensable au bon fonctionnement cérébral : la restauration des gradients ioniques générés par les courants post synaptiques, les potentiels d'action et l'absorption des neurotransmetteurs contribuent aux besoins du cerveau en énergie (Ames, 2000).

La molécule d'Adénosine Triphosphate (ATP) permet le stockage et le transport d'énergie, ce qui en fait un acteur phare du métabolisme énergétique. Cette molécule est synthétisée par les cellules selon trois étapes : la glycolyse, le cycle de Krebs, et la phosphorylation oxydative, qui sont détaillées ci-dessous.

#### 1.2.4. Glycolyse

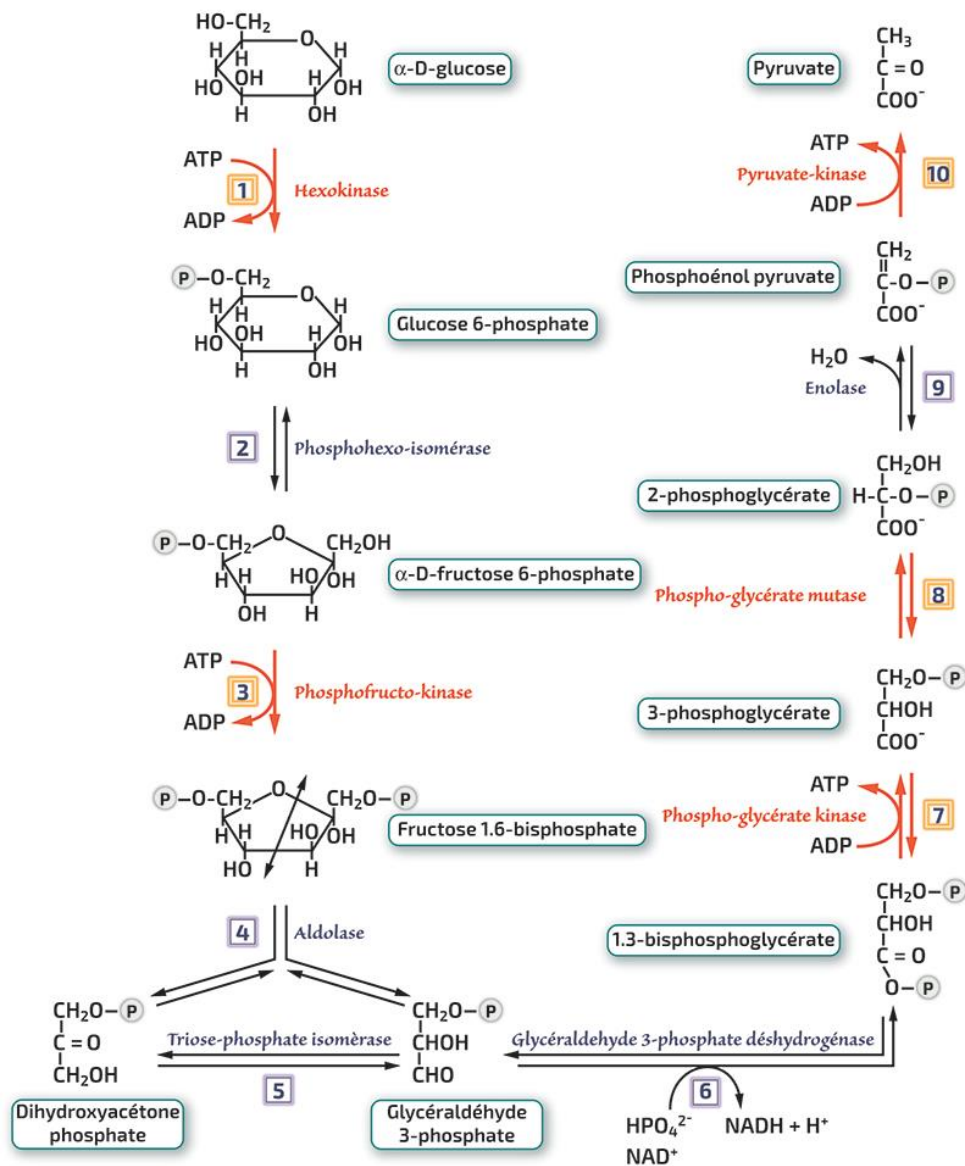
La glycolyse est une voie métabolique qui, grâce à une série de dix réactions enzymatiques, dégrade une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, selon l'équation bilan suivante :



Cette voie métabolique, qui ne consomme pas de dioxygène, permet la production de deux molécules d'ATP et surtout de pyruvate, qui sera le substrat principal du métabolisme oxydatif dans les mitochondries.

La glycolyse peut être divisée en deux phases :

- La première phase (étape 1 à 5), dite phase préparatoire ou d'investissement d'énergie, nécessite la consommation de deux molécules d'ATP pour phosphoryler les carbones C<sub>1</sub> et C<sub>6</sub> du glucose avant clivage.
- La seconde phase (étape 6 à 10), dite phase de remboursement ou de libération d'énergie, va permettre la synthèse de quatre molécules d'ATP, de deux molécules de NADH et de pyruvate.



**figure 1-5 :** Schéma des différentes étapes de la glycolyse, conduisant à la dégradation du glucose et la production d'ATP, appelée également voie d'Embden-Meyerhof. Tiré de Le métabolisme - Glycolyse | RN' Bio

La figure 1-5 illustre les différentes étapes nécessaires à la dégradation du glucose en pyruvate et ATP :

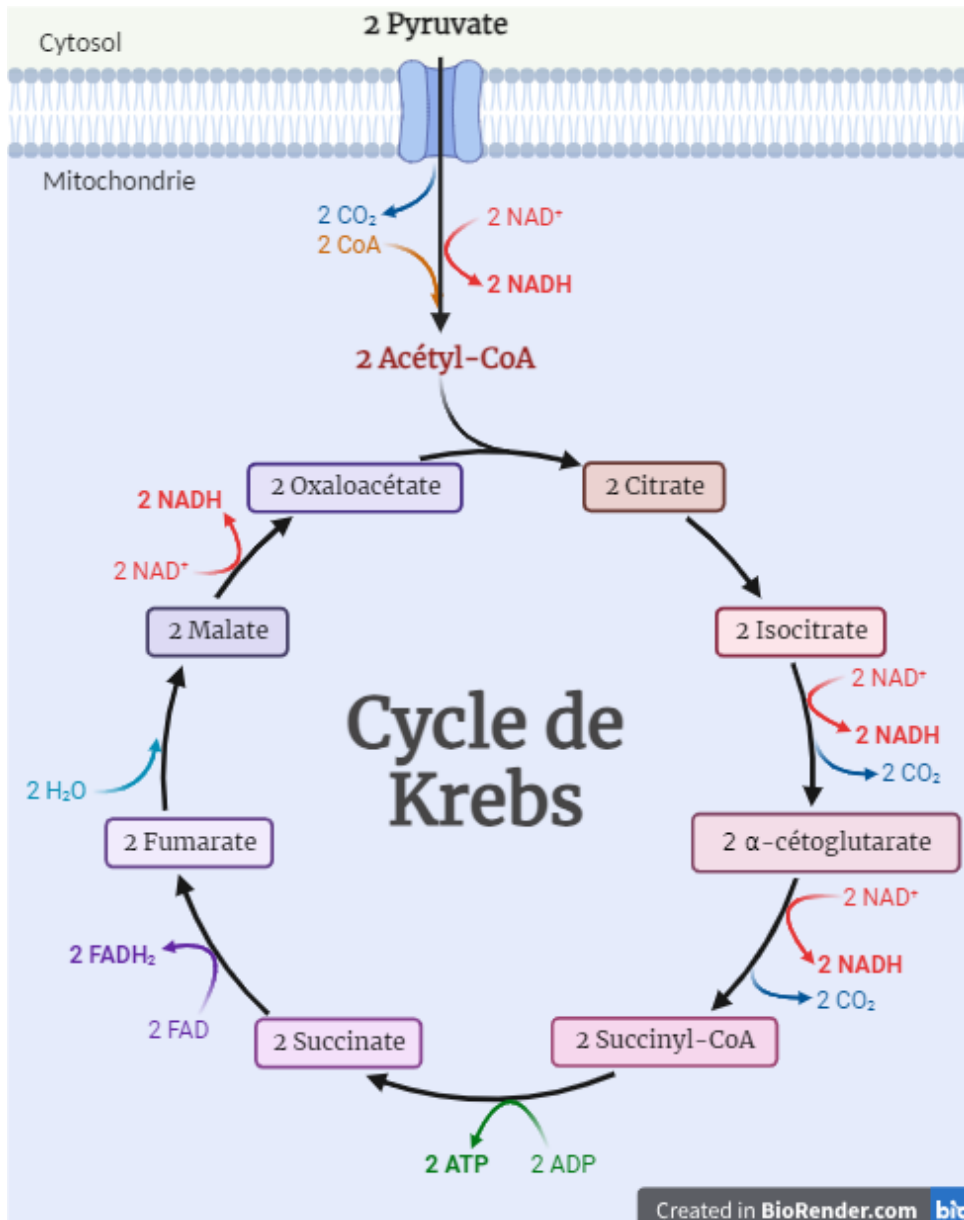
- 1) La première étape permet la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par la glycokinase ou l'hexokinase. Cette étape nécessite une molécule d'ATP, ce qui la rend irréversible, comme illustré sur la figure. Cette étape n'est pas spécifique de la glycolyse, puisqu'elle est commune à la glycogénolyse.

- 2) Le glucose-6-phosphate est ensuite isomérisé en fructose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate isomérase.
- 3) Le fructose-6-phosphate est alors phosphorylé en fructose-1,6-biphosphate par la phosphofructokinase-1. Il y a alors consommation de la deuxième molécule d'ATP, cette étape est donc également irréversible.
- 4) Le fructose-1,6-biphosphate formé est clivé par une lyase, l'aldolase, en deux molécules, le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate.
- 5) La dihydroxyacétone phosphate est ensuite isomérisée en glycéraldéhyde-3-phosphate par la triose-phosphate isomérase.
- 6) Les deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate sont phosphorylées en 1,3-biphosphoglycérate (ou acide 1,3-biphosphoglycérique) par la glycéraldéhyde - 3-phosphate déshydrogénase. En parallèle, les molécules de  $\text{NAD}^+$  sont réduites en  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .
- 7) Sous l'effet de la phosphoglycérate kinase, les deux acides 1,3-biphosphoglycériques formeront deux molécules de 3-phospho-D-glycérate, ce qui aura pour effet de phosphoryler deux molécules d'ADP en ATP.
- 8) Chaque 3-phospho-D-glycérate formé est isomérisé en 2-phospho-D-glycérate par la phosphoglycérate mutase
- 9) Sous effet de l'énolase (ou phosphopyruvate hydratase), chaque 2-phospho-D-glycérate formera le phosphoénolpyruvate par déshydratation.
- 10) Les deux molécules de phosphoénolpyruvate sont converties en pyruvate de façon irréversible via la pyruvate kinase, phosphorylant ainsi deux molécules d'ADP en ATP.

Ainsi, la glycolyse nécessite la consommation de deux moles d'ATP pour en produire quatre, ce qui résulte en deux moles d'ATP disponibles à la fin de la glycolyse.

### 1.3.2. Cycle de Krebs

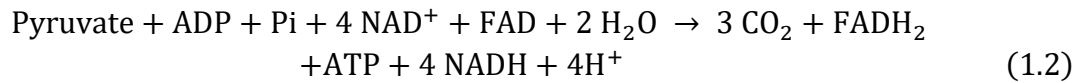
Le pyruvate formé peut ensuite être dégradé de deux façons en fonction des besoins énergétiques : soit en lactate par la lactate déshydrogénase (chapitre 1.4), soit en acétyl-CoA par décarboxylation oxydative, ce qui permet son entrée dans le cycle de Krebs.



**figure 1-6 :** Schéma des différentes étapes du cycle de Krebs, à partir des deux pyruvates formés grâce à la glycolyse et conduisant à la formation de 2 ATP et de 8 NADH. Adapté de Biorender.com

Le cycle de Krebs est une série de huit réactions enzymatiques qui prennent place dans la mitochondrie de la cellule (Ryan & O'Neill, 2020). Cette série de réactions résulte en la formation de deux molécules d'ATP et de quatre molécules de NADH,

selon l'équation bilan suivante :



La figure 1-6 illustre les huit étapes constituant le cycle de Krebs :

- 1) L'acétyl-CoA et l'oxaloacétate sont transformées en citrate.
- 2) Le citrate formé est déshydraté en cis-aconitate par l'aconitase, puis réhydraté en isocitrate.
- 3) L'isocitrate est oxydé en oxalosuccinate, transformant une molécule de  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ . L'oxalosuccinate est ensuite rapidement décarboxylée en  $\alpha$ -cétoglutarate, libérant une molécule de  $\text{CO}_2$ . Cette réaction est irréversible.
- 4) L' $\alpha$ -cétoglutarate est décarboxylée en succinyl-CoA, transformant une molécule de  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$  et libérant également une molécule de  $\text{CO}_2$ . Cette action est également irréversible.
- 5) La succinyl-CoA est transformée en succinate par la succinyl-CoA synthétase. Cette étape conduit à la libération d'un ATP à partir d'un ADP.
- 6) Le succinate est ensuite oxydé en fumarate par la succinate déshydrogénase, ce qui a pour conséquence de réduire le FAD en  $\text{FADH}_2$ .
- 7) Sous l'effet de la fumarase, le fumarate est hydraté en malate.
- 8) Le malate est ensuite oxydé en oxaloacétate, formant du  $\text{NADH}$  à partir de  $\text{NAD}^+$ . Cette réaction permet la fermeture du cycle.

A partir d'une mole de pyruvate, le cycle de Krebs mène donc à la production d'une mole d'ATP et de quatre moles de  $\text{NADH}$ . Cependant, la glycolyse produit deux moles de pyruvate à partir d'une mole de glucose. Ainsi, à partir d'une mole de glucose, la glycolyse et le cycle de Krebs fournissent un total de quatre moles d'ATP.



### 1.3.3. *Phosphorylation oxydative*

Les molécules de NADH et FADH<sub>2</sub> produites au cours des réactions précédemment sont impliquées dans un processus dit de phosphorylation oxydative, conduisant à la production de 32 moles d'ATP.

Il s'agit d'une combinaison d'enzymes et de cinq complexes enzymatiques travaillant en tandem pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Nous présenterons ici une explication très succincte de ce mécanisme.

Dans la membrane mitochondriale, quatre complexes enzymatiques forment une chaîne dite de transport d'électrons, ou respiratoire, qui va catalyser l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub>. Le flux de protons générés par la chaîne respiratoire permet alors de générer l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP à partir d'ADP, par l'ATP synthétase, le cinquième complexe enzymatique impliqué dans la phosphorylation oxydative (Saraste, 1999).

Chaque NADH va permettre de produire trois ATP, et chaque FADH<sub>2</sub> deux ATP. En tout, grâce aux 10 NADH, et 2 FADH<sub>2</sub> fournis par le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative conduit à la formation de 34 ATP, ce qui en fait la source principale d'ATP.

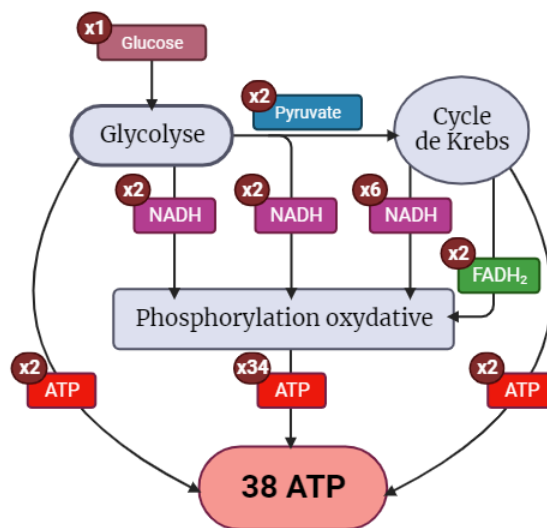
### 1.3.4. *Bilan énergétique*

Le bilan énergétique global est décrit figure 1-7. A partir d'un glucose, la glycolyse produit deux ATP, deux NADH, et deux pyruvates. Ces pyruvates entrent ensuite dans le cycle de Krebs en produisant deux NADH. Le cycle de Krebs aboutit ensuite à la production de deux ATP, six NADH, et deux FADH<sub>2</sub>. Les dix NADH et deux FADH<sub>2</sub> interviennent dans la phosphorylation oxydative, qui aboutit à la production de 34 ATP.

Ainsi, à partir d'un glucose, il est produit :

$$2 \text{ ATP}_{\text{glycolyse}} + 2 \text{ ATP}_{\text{Krebs}} + 34 \text{ ATP}_{\text{phosphorylation oxydative}} = 38 \text{ ATP}_{\text{total}}$$

Cette énergie n'est pas utilisée de manière homogène par toutes les cellules cérébrales. En effet, les cellules gliales ne consommeraient que 20 à 25 % de l'énergie, laissant aux neurones 75 à 80% d'énergie (J. J. Harris et al., 2012; Hyder et al., 2013).

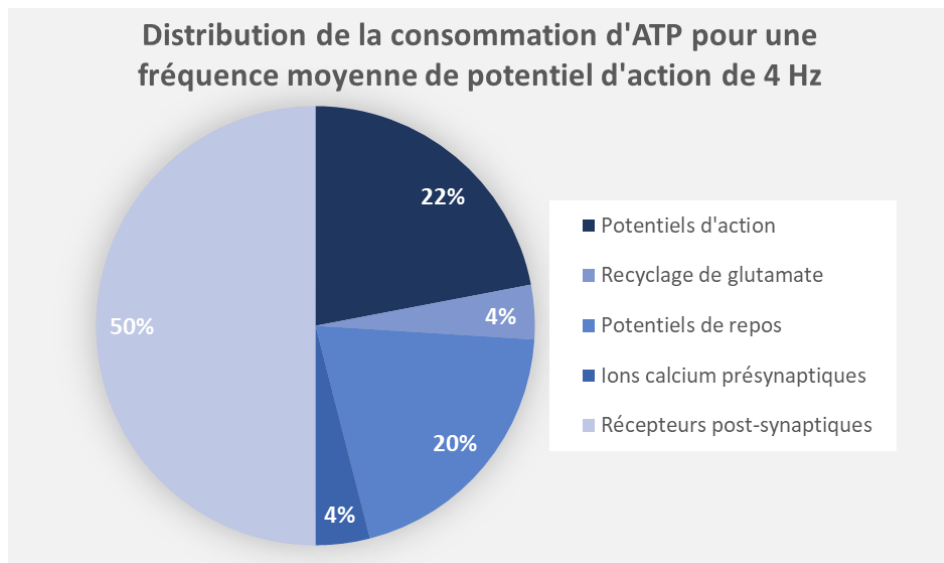


**figure 1-7 :** Bilan de synthèse d'ATP dans les cellules cérébrales, à partir d'un glucose. Créé avec BioRender.com

Les astrocytes, expriment de hauts niveaux du gène codant pour la PDH kinase 4, qui maintient l'enzyme pyruvate déshydrogénase dans un état phosphorylé. Cette enzyme régule l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs : plus elle est phosphorylée, moins elle est active, et moins le pyruvate sera dégradé en acétyl-CoA. Ce haut niveau de phosphorylation est donc en faveur de la production de lactate à partir de pyruvate (figure 1-9). Le lactate est ensuite exporté vers les neurones pour y être consommé. Ce mécanisme est expliqué au chapitre 1.4.

La figure 1-8 illustre la distribution de la consommation d'ATP pour les différents mécanismes neuronaux. La majorité de l'énergie utilisée pour la signalisation sera consommée à la synapse (J. J. Harris et al., 2012), via les récepteurs post-synaptiques, mais aussi par le recyclage de glutamate par les vésicules présynaptiques.

En raison de leur forte demande énergétique, le métabolisme oxydatif est donc préféré par les neurones (Boumezbeur et al., 2010) puisque plus efficace pour produire de l'énergie en grande quantité.



**figure 1-8 :** Distribution de l'utilisation d'ATP pour la transmission de l'information, via les différents mécanismes neuronaux impliqués, avec une fréquence de potentiel d'action des neurones de 4 Hz. 100% équivaut à  $3,29 \times 10^9$  ATP/neurone/seconde. Tiré de Attwell & Laughlin, 2001 et Harris et al., 2012.

#### 1.4. Mécanisme de la navette lactate et compartimentation du lactate

*« Il se passe toujours des trucs bizarres avec le lactate. »*

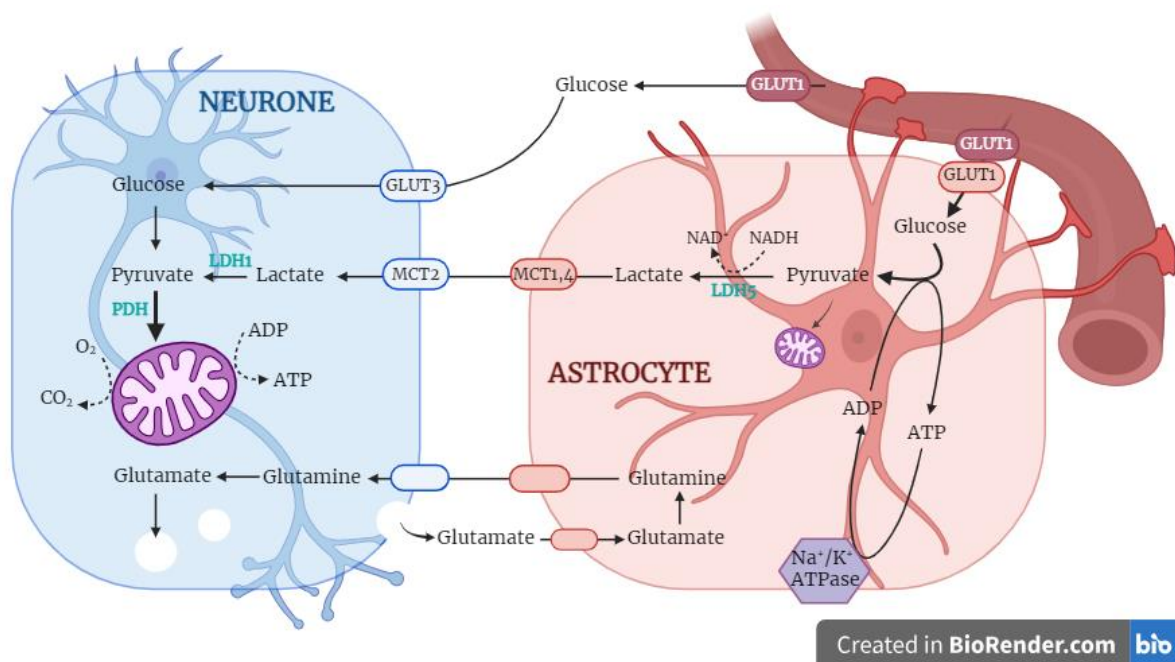
Julien Valette

Dans le cerveau, la concentration du lactate varie de 2 à 5 mM (Zilberter et al., 2010), avec une composante extracellulaire importante (Magistretti & Allaman, 2018), et est au moins dix fois plus importante que celle relevée pour le pyruvate (Gjedde & Magistretti, 2011).

Le lactate a longtemps joui d'une réputation de métabolite inutile, voire toxique. Ce n'est qu'à partir du milieu du XX<sup>ème</sup> siècle que des études ont commencé à montrer *in vitro* que le lactate était un très bon substrat énergétique neuronal (McIlwain, 1953).

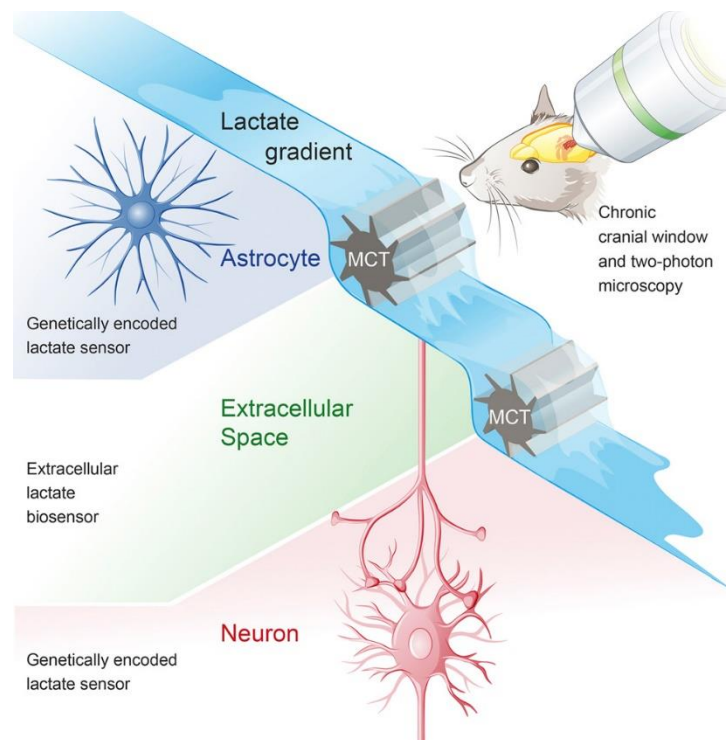
Plus tard, l'hypothèse de la navette lactate des astrocytes aux neurones (ANLS, pour « astrocyte to neuron lactate shuttle ») propose un mécanisme couplant la distribution en énergie et l'activité neuronale (Pellerin et al., 1998; Pellerin &

Magistretti, 1994), et était l'idée du lactate comme substrat énergétique neuronal proposée par Henry McIlwain en 1953. Selon cette théorie, le lactate est produit dans les astrocytes via glycolyse ou glycogénolyse (Weber & Barros, 2015) en réponse à une libération plus importante de glutamate (Pellerin & Magistretti, 1994) : le glutamate est libéré par les vésicules neuronales dans la fente synaptique, et recapturé par les astrocytes, où il est transformé en glutamine. La glutamine est exportée vers les neurones, où elle sera retransformée en glutamate. Ce cycle glutamate/glutamine demande un apport énergétique d'un ATP par molécule de glutamate (Watford, 2015), et déclenche une augmentation de la demande en glucose. Le glucose (ou le glycogène) est alors dégradé en pyruvate. Dans les astrocytes, la pyruvate déshydrogénase est dans un état phosphorylé, ce qui limite l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. Il est alors préférentiellement converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) 5. Le lactate est ensuite libéré dans l'espace extracellulaire par les transporteurs monocarboxylates (MCT) 1 et 4, puis capturé par les neurones par les MCT2, où il est retransformé en pyruvate par la LDH1. Le pyruvate ainsi formé peut ensuite être converti par la PDH pour entrer dans le cycle de Krebs (figure 1-9).



**figure 1-9** : Représentation schématique des échanges entre astrocytes et neurones. Le glutamate libéré par les vésicules neuronales est capturé par les astrocytes, converti en glutamine, et renvoyé aux neurones où il sera reconverti en glutamate. Ce cycle métabolique déclenche la capture de glucose par les neurones et astrocytes et la glycolyse. Dans les astrocytes, le pyruvate est principalement converti en lactate puis exporté vers les neurones, où il sera reconverti en pyruvate pour entrer dans le cycle de Krebs/phosphorylation oxydative. Inspiré de Magistretti & Allaman, 2015. Créé avec BioRender.com.

L'existence d'un gradient de concentration des astrocytes aux neurones, nécessaire pour le fonctionnement des MCT, a été démontrée *in vivo* par Mächler et al., 2016 : en combinant la microscopie par excitation à deux photons à des senseurs FRET encodés génétiquement, ils ont pu mesurer en temps réel le lactate présent dans les astrocytes, les neurones, et l'espace extracellulaire chez la souris, avant et pendant l'injection de lactate en voie intraveineuse. Ils ont pu démontrer que le niveau de lactate présent dans les neurones était significativement plus faible que dans les astrocytes. Ces résultats soutiennent le concept de lactate compartimenté, avec un gradient de concentration rendant possible un flux de lactate des astrocytes aux neurones (figure 1-10), soutenant donc la théorie de la navette lactate.



**figure 1-10** : Illustration de l'existence d'un gradient de concentration de lactate des astrocytes vers les neurones compatible avec l'ANLS : le niveau de lactate astrocytaire doit être plus important que dans les autres compartiments pour pouvoir être exporté jusqu'aux neurones. Tiré de Mächler et al., 2016.

De nombreuses études ont ensuite démontré que le lactate était préféré au glucose comme substrat énergétique neuronal, que ce soit *in vitro* (Bouzier-Sore et al., 2003; Larrabee, 1996; Zilberter et al., 2010) ou *in vivo* (Boumezbeur et al., 2010; D. Smith et al., 2003). Il a été montré que le lactate est impliqué dans la mémoire à long terme

(Newman et al., 2011), ainsi que dans la plasticité synaptique (Magistretti, 2014) en régulant l'expression des gènes (Yang et al., 2014). Un dérèglement du métabolisme du lactate serait également impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Newington et al., 2013).

Cependant, la compartimentation du lactate, c'est-à-dire sa distribution dans les compartiments cellulaires du cerveau, reste difficile à établir, en raison du manque d'outils à disposition permettant de le quantifier *in vivo* et d'évaluer sa distribution au sein des différents types cellulaires, ce qui a donné lieu à de nombreux débats, en particulier sur l'existence même de la navette lactate (Bak & Walls, 2018). La problématique principale réside dans le fait que les différents résultats obtenus ne permettent pas de trancher définitivement en faveur ou non de la navette lactate puisque les conditions d'expérimentation ne permettent pas de respecter les conditions physiologiques, que ce soit *in vitro* pour des raisons évidentes, ou *in vivo* puisque l'anesthésie et les mesures souvent très invasives affectent le métabolisme (Barros & Weber, 2018).

Dans ces conditions, il serait alors très intéressant de disposer d'un outil permettant de quantifier de manière non-invasive la compartimentation du lactate. Dans cet objectif, on se propose d'utiliser la spectroscopie RMN pondérée en diffusion.

## 2. HISTOIRE ET PRINCIPES DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

L'histoire de la résonance magnétique nucléaire (RMN) commence au début des années 1920, lorsque Stern et Gerlach découvrent une propriété quantique de l'atome, le spin.

La découverte à proprement parler de la RMN date de 1946, lorsque deux équipes, menées par Purcell et Bloch, réalisent indépendamment que l'absorption et l'émission d'ondes électromagnétiques par des noyaux peuvent être observées lorsqu'ils sont placés dans un fort champ magnétique externe (Bloch, 1946; Purcell et al., 1946). Leur découverte est récompensée par le prix Nobel de physique de 1952.

Peu avant cette distinction, en 1950, Proctor et Yu d'une part et Dickinson d'autre part découvrent, eux aussi indépendamment, que les noyaux d'une même molécule absorbent l'énergie à différentes fréquences de résonance. Cette découverte annonce les débuts de la spectroscopie RMN.

En 1966, Ernst et Anderson révolutionnent les méthodes d'acquisitions spectrales en introduisant les impulsions RMN couplées aux transformées de Fourier. Ces techniques constituent la base de toute expérience RMN moderne (de Graaf, 2007).

Dans ce chapitre, nous aborderons les principes de base de la RMN nécessaires à la compréhension du sujet. Pour une explication plus détaillée, nous invitons le lecteur à consulter des ouvrages de référence (par exemple de Graaf, 2007).

### 2.1. Description semi-classique du signal RMN...

La précession du noyau d'un atome, chargé positivement, induit un champ magnétique correspondant au moment magnétique intrinsèque  $\mu$ , que l'on appelle également spin, et défini par

$$\mu = \gamma I \frac{h}{2\pi} \quad (\text{II. 1.1})$$

avec  $h$  la constante de Planck ( $h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$ ),  $\gamma$  le rapport gyromagnétique de l'atome qui s'exprime en  $\text{rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , et  $I$  le nombre quantique de spin.

Lorsque l'atome est soumis à un champ magnétique externe  $B_0$ , par convention orienté selon l'axe  $z$  du repère orthonormé, l'atome peut adopter différentes orientations. Le nombre de spin détermine ce nombre d'orientations possibles.

Pour un noyau de spin  $I$ , on y associe  $2I + 1$  états quantiques. Ainsi, pour l'atome d'hydrogène, atome d'intérêt ici et présent en très grande quantité dans les milieux biologiques avec une abondance naturelle supérieure à 99,9%, dont le spin est de  $1/2$ , il existe deux états valant  $1/2$  (spin up) et  $-1/2$  (spin down). Les populations sont donc réparties sur deux niveaux d'énergie (figure 2-1) correspondant à l'énergie magnétique associée au moment magnétique  $\mu$ , telle que définie classiquement par :

$$E = -\mu \cdot B_0 \cos(\theta) \quad (\text{II. 1.2})$$

avec  $\theta$  l'angle entre le moment magnétique  $\mu$  et le champ magnétique  $B_0$ .

En d'autres termes, l'application d'un champ magnétique  $B_0$  externe induit donc une levée de dégénérescence permettant la séparation des spin up et down avec les énergies respectives  $E_{-\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$  et  $E_{\frac{1}{2}} = -\frac{1}{2} \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$ . Il s'agit de l'effet Zeeman.

La différence d'énergie entre les niveaux up et down correspond à une onde de fréquence définie par la relation de Planck-Einstein telle que :

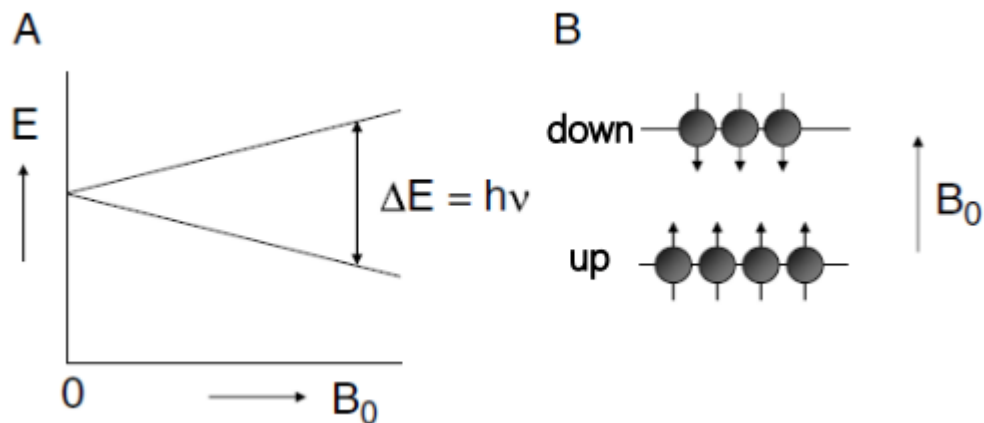
$$\frac{\Delta E}{h} = \nu_0. \quad (\text{II. 1.3})$$

On en déduit :

$$\nu_0 = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0. \quad (\text{II. 1.4})$$

Il s'agit de la fréquence de Larmor, qui correspond à la fréquence de résonance des particules de spin  $1/2$  soumises à un champ magnétique externe  $B_0$ .





**figure 2-1 : A.** Energie pour un noyau de spin 1/2 en fonction de la force de champ magnétique  $B_0$ . **B.** Répartition des spins sur les niveaux d'énergie. Les plus bas niveaux d'énergie (down) correspondent à un moment magnétique parallèle à  $B_0$ , tandis que les spins dans l'état up (plus haut niveau d'énergie) ont un alignement antiparallèle avec  $B_0$ . Tiré de de Graaf, 2007.

Bien qu'en théorie l'état « up » soit plus peuplé en raison de sa basse énergie, l'agitation thermique tend à équilibrer le peuplement des deux états. Le ratio de population entre les niveaux « up » et « down » est donné par la statistique de Maxwell-Boltzmann, et dépend de la température  $T$  du système :

$$\frac{n_{\text{up}}}{n_{\text{down}}} = e^{\Delta E/kT} = e^{h\nu/kT} \quad (\text{II. 1.6})$$

avec  $n_{\text{down}}$  et  $n_{\text{up}}$  la population des niveaux de haute et de basse énergie respectivement, et  $k$  la constante de Boltzmann. Si l'on considère que  $h\nu$  est très petit devant l'énergie thermique  $kT$ , on peut simplifier l'équation (I.2.6) telle que :

$$\frac{n_{\text{up}}}{n_{\text{down}}} = 1 + \frac{h\nu}{kT} \quad (\text{II. 1.7})$$

Les moments magnétiques des spins parallèles et antiparallèles ne se compensent pas totalement, ce qui a pour conséquence l'apparition d'une aimantation  $M_0$  de même sens et même orientation que  $B_0$ , qui s'exprime sous la forme :

$$M_0 = \sum_{i=1}^n \mu_i = (n_{\text{up}} - n_{\text{down}}) \times \mu \quad (\text{II. 1.8})$$

A partir de l'équation (II.1.7), en considérant que  $n = n_{\text{up}} + n_{\text{down}}$  où  $n$  est le nombre

total de spins dans l'échantillon, la différence de population  $n_{\text{up}} - n_{\text{down}}$  est donnée par :

$$n_{\text{up}} - n_{\text{down}} \approx \frac{nh\nu}{2kT}. \quad (\text{II. 1.9})$$

Regroupant les équations (II.1.8) et (II.1.9), la magnétisation peut alors s'écrire sous la forme :

$$M_0 = \left(\frac{\gamma h}{2\pi}\right)^2 \frac{nB_0}{4kT}. \quad (\text{II. 1.10})$$

De l'équation (II.1.10), on peut en déduire que l'intensité de  $M_0$  est proportionnelle au champ  $B_0$ . Elle augmente également avec le carré du rapport gyromagnétique, ce qui justifie l'utilisation du proton, dont le rapport gyromagnétique est un des plus élevés, pour la majorité des techniques de RMN.

Par contre, à l'équilibre thermique, dans le plan transversal  $xy$  perpendiculaire à  $B_0$ , la résultante de l'aimantation est nulle.

L'application d'une onde électromagnétique de champ  $B_1$  oscillant à la fréquence de Larmor dans le plan transverse induit des transitions des spins d'un état d'énergie à un autre, provoquant une bascule de l'aimantation dans le plan  $xy$  d'un angle  $\theta$  dit angle de nutation, proportionnel à  $\gamma B_1$  et donné par, pour un  $B_1$  constant et une onde électromagnétique à la fréquence de Larmor :

$$\theta = \gamma B_1 T_i \quad (\text{II. 1.11})$$

avec  $T_i$  la durée de l'impulsion.

Deux phénomènes ont alors lieu : l'énergie acquise est dissipée et l'aimantation revient à l'équilibre thermodynamique le long de  $B_0$ , c'est la relaxation  $T_1$  ; et les spins perdent progressivement leur cohérence de phase dans le plan transverse, c'est la relaxation  $T_2$ .

Le signal RMN correspond à la mesure au cours du temps de l'aimantation macroscopique, suite à sa bascule, pendant son retour progressif à l'état d'équilibre. En effet, l'aimantation transverse précesse autour de  $B_0$  à la fréquence de Larmor, ce qui induit une variation de flux magnétique dans l'antenne radiofréquence, et donc une tension mesurable aux bornes de l'antenne.

De manière générale, l'évolution de l'aimantation macroscopique en présence d'un

champ statique  $B_0$  selon l'axe  $z$  et d'une onde électromagnétique  $B_1$  dans le plan  $xy$ , est décrite classiquement par les équations de Bloch :

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma[M_y(t)B_0(t) - M_z(t)B_{1y}(t)] - \frac{M_x(t)}{T_2} \quad (\text{II. 1.12. a})$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma[M_z(t)B_{1x}(t) - M_x(t)B_0(t)] - \frac{M_y(t)}{T_2} \quad (\text{II. 1.12. b})$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma[M_x(t)B_{1y}(t) - M_y(t)B_{1x}(t)] - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \quad (\text{II. 1.12. c})$$

L'effet Zeeman et la fréquence de Larmor sont la base de tout signal RMN : sans effet Zeeman, il n'y a pas de signal RMN, et ce signal peut être modulé à l'aide d'ondes électromagnétiques oscillant à la fréquence de Larmor. Les impulsions utilisées pour générer ces bascules d'aimantation sont discutées chapitre 2.4

## 2.2.... et sa description quantique

Ces quelques explications, très succinctes permettront au lecteur d'appréhender la suite du chapitre concernant le couplage  $J$ . Nous invitons le lecteur à consulter l'ouvrage de Malcolm H. Levitt (Levitt, 2008) pour des informations plus détaillées sur le sujet.

En mécanique quantique, on utilise un opérateur hermitien appelé une observable pour mesurer une grandeur physique. Il est caractérisé par des valeurs propres représentant les valeurs possibles de cette grandeur, et par des vecteurs propres représentant les états associés. La description d'un système se fait donc grâce à un vecteur d'état  $\Psi$ , développé sur la base des vecteurs propres  $\Phi$  d'une observable  $A$ . Ainsi, pour un système contenant de nombreuses particules se trouvant dans un mélange d'états quantiques  $|\Psi_i\rangle$  de proportion  $p_i$ , on définit un opérateur densité par

$$\rho = \sum p_i |\Psi_i\rangle \langle \Psi_i| \quad (\text{II. 2.1})$$

La valeur moyenne de l'observable  $A$  sur l'ensemble du système s'exprime en fonction

de l'opérateur densité  $\rho$  par :

$$\langle A \rangle = \text{Tr}(A\rho) \quad (\text{II. 2.2})$$

avec  $\text{Tr}$  la somme des éléments diagonaux de l'opérateur. D'après la relation (II.2.1), l'équation du mouvement de  $\rho$  s'écrit alors

$$\frac{d}{dt}\rho = \sum p_i \frac{d}{dt} |\Psi_i\rangle\langle\Psi_i| \quad (\text{II. 2.3})$$

menant à l'équation d'évolution de Liouville-von Neumann :

$$\frac{d}{dt}\rho = \frac{i}{\hbar}(\rho H - H\rho) \quad (\text{II. 2.4})$$

avec  $H$  l'hamiltonien (défini par  $H = \omega I$  dans le cas d'un spin isolé). La solution de l'équation de Liouville-von Neumann est, alors, pour  $H$  constant,

$$\rho(t) = e^{-iHt}\rho(0)e^{iHt}. \quad (\text{II. 2.5})$$

En RMN, les états d'intérêt sont, comme déjà évoqué, l'aimantation longitudinale  $M_z$ , associée à l'opérateur  $I_z$ , et les aimantations transversales  $M_x$  et  $M_y$ , associées aux opérateurs  $I_x$  et  $I_y$  respectivement.

Expérimentalement, la RMN consiste alors en la détection et la mesure du signal provenant de l'aimantation  $M_+ = M_x + iM_y$  (associé à l'opérateur  $I_+ = I_x + iI_y$ ). L'hamiltonien prédit le comportement des spins, étant lié aux interactions internes (couplages) et externes (champ magnétique ambiant, impulsions RF). Lorsque l'on applique le champ  $B_1$  autour de  $y$  pendant une durée  $\tau$ , l'hamiltonien est donné par

$$H_1 = \omega_1 \times I_y = \gamma B_1 \times I_y \quad (\text{II. 2.6})$$

L'opérateur densité, quant à lui, est déduit de l'équation (II.2.5) :

$$\rho(t) = \cos(\theta) I_z + \sin(\theta) I_x \quad (\text{II. 2.7})$$

avec  $\theta = \gamma B_1 t$ . On suppose ici que l'impulsion est suffisamment courte pour négliger la précession autour de  $B_0$  durant l'impulsion.

A  $t=0$  juste après l'impulsion de  $90^\circ$ , on en déduit que la précession de l'aimantation basculée dans le plan transverse à l'aide d'un opérateur densité  $\rho$  tel que :

$$\rho(t) = \cos(\omega_0 t) I_x + \sin(\omega_0 t) I_y. \quad (\text{II. 2.8})$$

### 2.3. Déplacement chimique pour distinguer des molécules en RMN

Les électrons qui gravitent autour du noyau d'un atome induisent un champ magnétique qui s'oppose au champ  $B_0$ . Le noyau est alors dit blindé, et le champ magnétique ressenti par le noyau ne sera donc pas  $B_0$  mais un champ magnétique  $B_{\text{eff}}$  qui correspond à

$$B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma) \quad (\text{II. 3.1})$$

avec  $\sigma$  la constante d'écran induite par le nuage électronique. On en déduit alors une fréquence de résonance effective  $\omega_{\text{eff}}$  propre à chaque molécule qui s'exprime sous la forme :

$$\omega_{\text{eff}} = \gamma B_{\text{eff}} \cdot \quad (\text{II. 3.2})$$

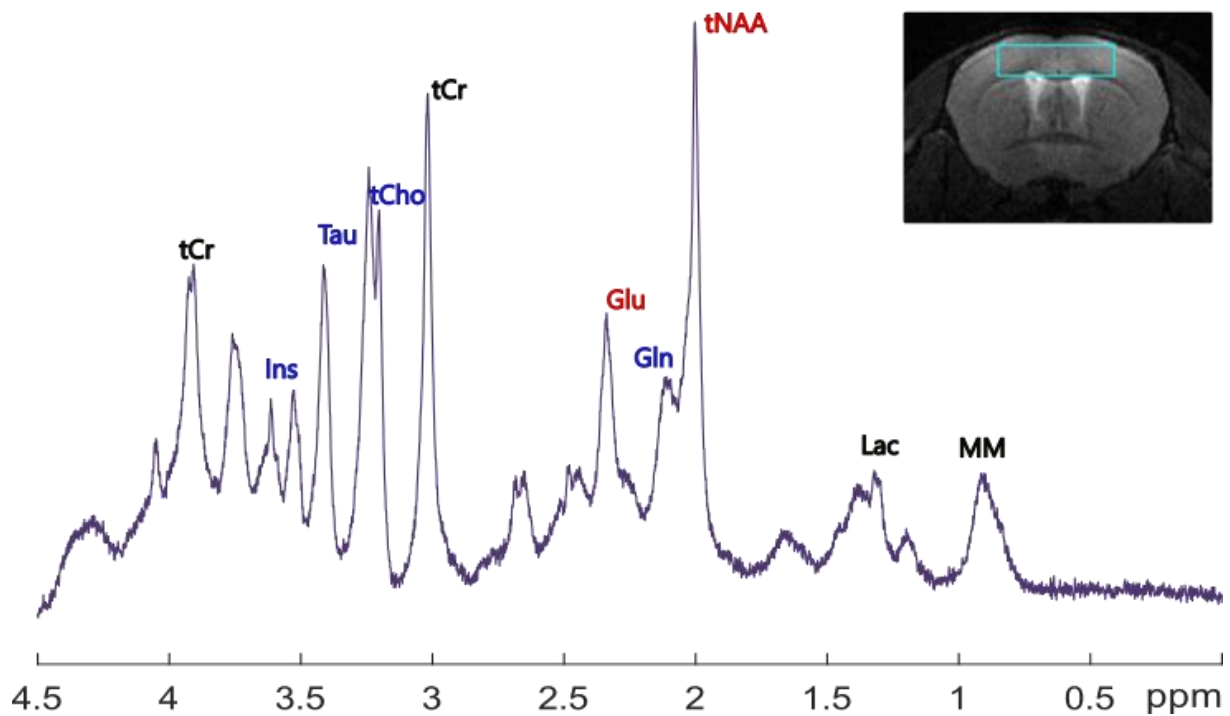
Le déplacement chimique se définit en partie par million (ppm) :

$$\delta = \frac{10^6(\omega_{\text{eff}} - \omega_{\text{ref}})}{\omega_{\text{ref}}} \cdot \quad (\text{II. 3.3})$$

On remarque que la mesure de déplacement chimique se fait à partir d'une référence, dont la fréquence de résonance est notée  $\omega_{\text{ref}}$ , correspondant à  $\delta=0$  par convention. Pour la spectroscopie RMN du proton, du carbone 13 et du silicium 29, on utilise le tétraméthylsilane (TMS), qui a comme particularité d'avoir une constante d'écran très forte. Plus la constante d'écran est faible, donc moins la molécule est blindée, et plus le déplacement chimique est important.

En spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ , l'eau, par exemple, résonne à 4,7 ppm, et la majorité des métabolites cérébraux ont une résonance comprise entre 0 et 4,5 ppm, comme illustré figure 2-2. Les déplacements chimiques donnent des informations directes sur l'environnement chimique des noyaux, ce qui permet d'identifier et d'assigner les différentes raies aux différents métabolites.

L'intensité des pics des différentes résonances est en principe directement proportionnelle à la concentration des métabolites (corrigé de la relaxation), ce qui fait de la spectroscopie RMN une technique quantitative.



**figure 2-2 :** spectre de métabolites, acquis expérimentalement à 11,7 T dans un voxel cortical de 15  $\mu$ L sur 4 souris avec une séquence LASER. Les métabolites principalement neuronaux sont en rouge, ceux majoritairement astrocytaires en bleu.

## 2.4. Les impulsions RF et adiabatiques

Les impulsions radiofréquence (RF) sont l'outil principal permettant de manipuler les spins à sa convenance. Les impulsions courtes, intenses, et à amplitude constante, appelées impulsions carrées, permettent d'obtenir une excitation uniforme des spins pour une impulsion très courte, et sont les plus courantes d'utilisation. Cependant, elles ne suffisent pas pour la majorité des expériences RMN *in vivo*, qui requièrent une sélectivité spécifique, par exemple pour la suppression de l'eau, la localisation spatiale, ou encore s'affranchir du couplage J de certains métabolites.

### 2.1.1. Les impulsions classiques

Le champ  $B_1$  généré par les impulsions oscille très rarement exactement à la fréquence de Larmor. La différence entre la fréquence  $\omega$  du champ  $B_1$  et la fréquence

de Larmor  $\omega_0$  est définie par  $\Delta\Omega$  et correspond aux effets hors-résonance. Si l'amplitude de l'impulsion est suffisamment importante, et sa durée suffisamment courte, les effets hors-résonance peuvent être négligés et l'angle de nutation est proportionnellement linéaire à  $\gamma B_1$  et est donné par l'équation (I.2.11).

Dans certaines situations expérimentales, l'amplitude de l'impulsion radiofréquence n'est cependant pas suffisamment importante, et les effets hors résonance ne peuvent plus être ignorés. Dans ce cas, la magnétisation tourne autour d'un champ effectif  $B_e$  incliné, dont l'amplitude est donnée par

$$B_e = \sqrt{B_1 + \left(\frac{\Delta\Omega}{\gamma}\right)^2} \quad (\text{II. 4.1})$$

Ces impulsions sont loin d'être optimales pour un champ  $B_1$  inhomogène, ce qui sera le cas lors d'utilisation d'antennes de transmission surfaciques, ou à très haut champ magnétique. Dans ce travail de thèse, nous y sommes particulièrement sensibles puisque nous opérons à 11,7 T et l'antenne cryogénique que nous utilisons est une antenne surfacique. Il est donc nécessaire d'utiliser des impulsions plus optimisées afin de s'en affranchir au maximum.

### 2.1.2. *Les impulsions adiabatiques et leur particularité*

Le principe de ces impulsions est d'effectuer un balayage de fréquences autour de la fréquence d'intérêt en modulant l'intensité du champ  $B_1$  et leur fréquence  $\omega$  (Garwood & DelaBarre, 2001). Elles permettent d'inverser l'aimantation de façon très homogène malgré les inhomogénéités de champ.

Il existe deux types d'impulsions adiabatiques : les AFP, pour « adiabatic full passage » qui sont des impulsions d'inversion et de refocalisation, à 180°, et les AHP pour « adiabatic half passage » qui sont des impulsions à 90° que l'on peut utiliser pour l'excitation.

Les AFP fonctionnent par paire : en effet, l'application d'une impulsion génère un déphasage non linéaire, qui peut néanmoins être compensé par l'application d'une seconde impulsion identique à la première. Dans ce travail de thèse, nous utilisons des impulsions sécantes hyperboliques, définies par

$$B_1(t) = B_{1\max} \operatorname{sech} \left( \beta \left( 1 - \frac{2t}{T} \right) \right) \quad (\text{II. 4.2. a})$$

$$\omega(t) = \omega_{\max} \tanh \left( \beta \left( 1 - \frac{2t}{T} \right) \right) \quad (\text{II. 4.2. b})$$

Pour que la bascule de l'aimantation soit complète, Il faut que le champ effectif  $B_e$  bascule suffisamment lentement par rapport à la précession de la magnétisation autour de  $B_e$ . Exprimé autrement, on doit avoir

$$\frac{d\alpha(t)}{dt} \ll \gamma B_e \quad (\text{II. 4.3})$$

avec  $\alpha(t) = \tan^{-1} \left( \frac{\gamma B_1(t)}{\Delta\omega(t)} \right)$ . Il s'agit de la condition dite d'adiabaticité.

Si  $B_1(t)$  est intense, la bascule de l'aimantation ne dépend plus de l'intensité de l'impulsion. Cette condition est facilement remplie avec les petites antennes surfaciques qui permettent d'atteindre un champ  $B_1$  très intense près de l'antenne.

### 2.1.3. *Les impulsions sélectives et l'algorithme de Shinnar-Le Roux*

Une impulsion sélective va permettre, en fonction de la longueur de la bande passante choisie, de n'exciter qu'une ou plusieurs parties des résonances qui apparaissent sur le spectre RMN.

L'algorithme de Shinnar-Le Roux permet la création d'impulsions sélectives optimisées en prodiguant une relation entre l'amplitude  $B_1(t)$  et la phase  $\varphi(t)$  d'une impulsion RF, et deux exponentielles complexes A et B où B est une approximation du profil de magnétisation désiré et A est calculé à partir de B pour générer une impulsion RF unique de puissance minimisée (Pauly et al., 1991). Pour une explication plus détaillée, nous invitons le lecteur à consulter le manuscrit de thèse de Patrick Le Roux, bien plus complet sur le sujet (Le Roux, 2006).

Les impulsions sélectives que nous utilisons dans ce travail de thèse ont été générées via cet algorithme et seront détaillées chapitre 5.



## 2.5. Couplage J

Lorsque des interactions surviennent entre les noyaux atomiques d'une même molécule via les électrons de liaisons, des doublets, triplets ou multiplets apparaissent sur les spectres RMN : il s'agit du couplage J, ou couplage scalaire spin-spin. En spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ , le lactate est réputé pour son intense couplage entre ses deux résonances : entre le groupement  $^2\text{CH}$  situé à 4,09 ppm et  $^3\text{CH}_3$  situé à 1,31 ppm (figure 2-3).

Au lieu d'une modification locale du champ magnétique, il y a multiplication des niveaux d'énergie, transformant les raies en plusieurs raies d'intensités variables et d'espacement caractéristique ayant une fréquence fixe : c'est la constante de couplage J. Les couplages étant à l'origine d'une perte importante de signal avec l'augmentation du temps d'écho (TE), il serait avantageux de pouvoir supprimer l'effet de ces couplages.

Plongeons-nous dans quelques notions de mécanique quantique pour appréhender ce problème, et comprendre comment s'en affranchir.

Dans le cas de spins I et S faiblement couplés, précessant autour de  $B_0$ , leur hamiltonien est défini par :

$$H = \omega_{0I}I_z + \omega_{0S}S_z + 2\pi J I_z S_z \quad (\text{II. 5.1})$$

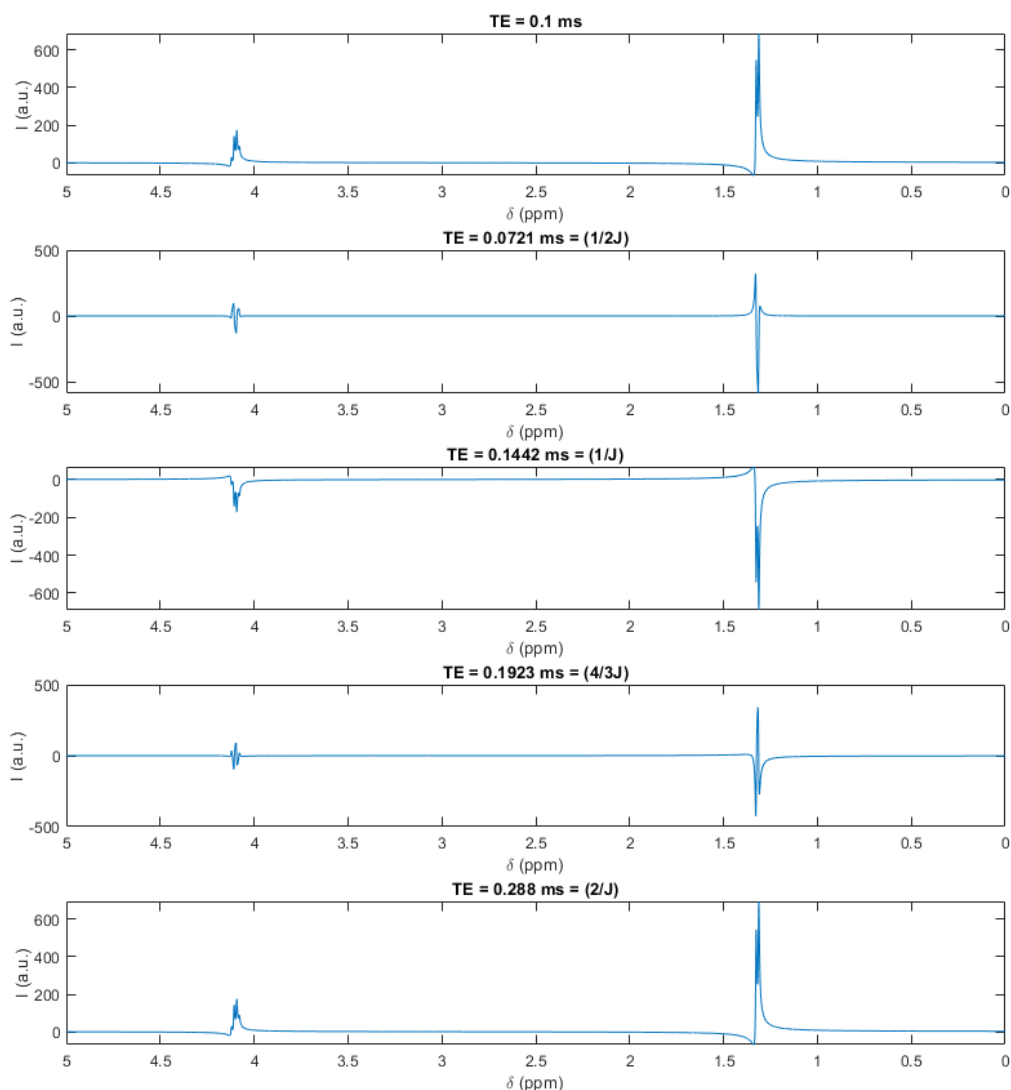
avec J leur constante de couplage et  $\omega_{0I}$  et  $\omega_{0S}$  leur fréquence de Larmor respective.

En précession libre, si on s'intéresse seulement à I, et que, pour simplifier,  $\omega_{0I} = 0$ , on peut montrer que

$$\rho(t) = \cos(\pi J t) I_x + \sin(\pi J t) 2I_y S_z \quad (\text{II. 5.2})$$

Cette équation montre que l'opérateur densité  $\rho$  oscille à la fréquence J/2 entre les deux modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_y S_z$ .

Le mode  $2I_y S_z$  correspondant à un mode non observable en imagerie, le signal dans le plan transverse s'annule à chaque passage par ce mode. En pratique, ces annulations provoquent une superposition des deux modes, menant à une décroissance du signal : il s'agit de la J-modulation.

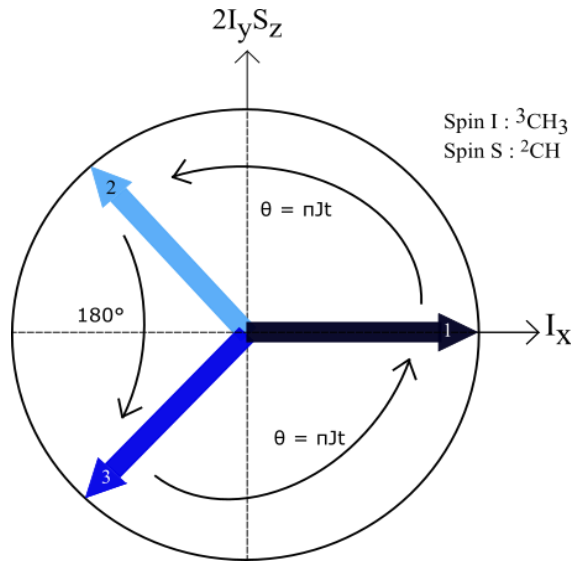


**figure 2-3** : modélisation du comportement du spectre RMN du lactate à différents temps d'écho. On remarque que le signal est modulé selon  $TE = 1/J$ , et qu'il est au maximum de son intensité pour  $TE = 2/J$ .

Si l'on considère l'opérateur densité préalablement présenté et que l'on prend pour exemple la molécule de lactate, on se place dans un système de deux spins I et S, où I appartient au groupement  $^3\text{CH}_3$  et S au groupement  $^2\text{CH}$ . Dans ce cas, on cherche à observer I.

Lorsque l'on applique une impulsion sélective de  $90^\circ$  plaçant l'opérateur densité dans l'état de cohérence  $I_x$ , il oscille entre les deux modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_yS_z$  à la fréquence  $J/2$  (figure 2-4, 1 à 2). On applique ensuite une impulsion de  $180^\circ$  selon x, dont la bande passante n'inclut que le  $^3\text{CH}_3$ . Juste avant l'impulsion, à  $t = \tau^-$ , on a :

$$\rho(\tau^-) = \cos(\pi J \tau^-) I_x + \sin(\pi J \tau^-) 2I_y S_z. \quad (\text{II. 5.3})$$



**figure 2-4 :** Oscillation de l'opérateur densité entre les modes de cohérence  $I_x$  et  $2I_yS_z$  après une impulsion de  $90^\circ$ . 1 :  $\rho$  est selon  $I_x$  et évolue au cours du temps d'un angle  $\theta = \pi Jt$  jusqu'à la position 2. L'application d'une impulsion de  $180^\circ$  sélective selon  $x$  provoque une rotation selon  $y$  et amène  $\rho$  à la position 3.  $\rho$  évolue jusqu'à la position 1. Inspiré de de Graaf, 2007.

Si l'impulsion n'est pas sélective, c'est-à-dire agissant sur  $I$  et  $S$ ,  $y$  se transforme en  $-y$  sur  $I$  et  $z$  en  $-z$  sur  $S$ , ce qui laisse l'opérateur densité inchangé, et on a alors à la fin de l'évolution :

$$\rho(2\tau) = \cos(2\pi J\tau) I_x + \sin(2\pi J\tau) 2I_yS_z. \quad (\text{II. 5.4})$$

Dans le cas d'une impulsion sélective de  $I$ , après impulsion, à  $t = \tau +$ , on a :

$$\rho(\tau^+) = \cos(\pi J\tau^+) I_x - \sin(\pi J\tau^+) 2I_yS_z. \quad (\text{II. 5.5})$$

L'impulsion sélective selon  $x$  a pour conséquence de transformer  $y$  en  $-y$  sur  $I$  uniquement, (figure 2-4, 2 à 3). Le système évolue ensuite en partant de l'état précédent pendant une nouvelle durée  $\tau$  (figure 2-4, 3 à 1), menant, après simplification à

$$\rho(2\tau) = I_x \quad (\text{II. 5.7})$$

Les effets du couplage sont donc supprimés à l'écho, et l'opérateur densité est bien revenu à son état initial  $I_x$ . Le choix de la bande passante des impulsions sélectives de  $180^\circ$  est très important : dans le cas du lactate, une bande passante ne sélectionnant que la résonance à 1,31 ppm et excluant celle à 4,1 ppm empêche la formation d'un couplage à l'écho, ce qui permet d'avoir un signal maximisé.

## 2.6. La localisation du voxel en spectroscopie

Le cerveau est constitué en majorité d'eau, et les métabolites ne représentent qu'une infime fraction du volume cérébral. En spectroscopie, il est donc courant de moyenner le signal acquis dans un volume d'intérêt, ou voxel, « le plus grand et homogène possible ». Le plus grand afin de pouvoir détecter et maximiser le signal des métabolites, et de composition la plus homogène possible, c'est-à-dire sans lipides présents dans la peau ou les muscles et l'os, qui contribuent fortement au signal et ont pour effet de déformer les spectres. En prenant en compte ces considérations, la localisation du voxel est d'une importance capitale pour avoir le meilleur signal possible. Enfin, il est d'autant plus intéressant d'obtenir une localisation précise du voxel pour étudier certaines régions du cerveau, puisqu'elles peuvent présenter des propriétés de diffusion différentes. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, par exemple, le cortex et l'hippocampe sont des régions cérébrales particulièrement atteintes (Garcia-Alloza et al., 2006), tandis que les modèles murins de la maladie d'Huntington présentent une atrophie précoce du striatum (Ratray et al., 2013).

Pour localiser notre volume d'intérêt, on utilise des gradients de sélections de coupes, dans les trois directions, couplés à des impulsions d'excitation/refocalisation (traditionnellement des impulsions adiabatiques). En présence de gradients, la fréquence de résonance des spins dépend de leur position  $x$  dans une direction :

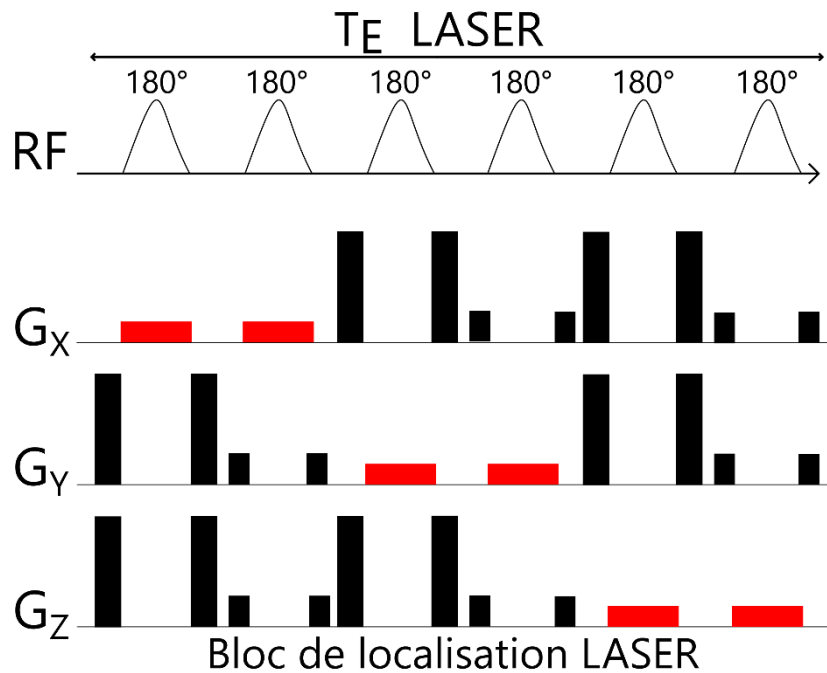
$$\omega(x) = \gamma(B_0 + G_x x) = \omega_0 + \gamma G_x x. \quad (\text{II. 6.1})$$

Les gradients de sélection sont appliqués avec une intensité qui dépend de la bande passante  $\Delta\omega$  de l'impulsion radiofréquence et de l'épaisseur des coupes  $\Delta x$  telle que :

$$G_x = \frac{\Delta\omega}{\gamma\Delta x} \quad (\text{II. 6.2})$$

Bien qu'il existe plusieurs séquences pour la localisation du voxel (STEAM, PRESS...) nous utilisons dans l'équipe la séquence LASER, pour Localization by Adiabatic SElective Refocusing, développée initialement par (Garwood & DelaBarre, 2001) et illustrée par la figure 2-5. Cette séquence est basée sur l'utilisation de trois paires d'AFP, soit une paire par dimension de l'espace. Chaque paire inverse l'aimantation sur un intervalle de fréquence donné et permet de sélectionner une tranche d'aimantation, perpendiculaire aux deux autres. L'aimantation en dehors du volume d'intérêt est quant

à elle déphasée grâce aux crushers de part et d'autre des AFP (en noir sur la figure 2.5).



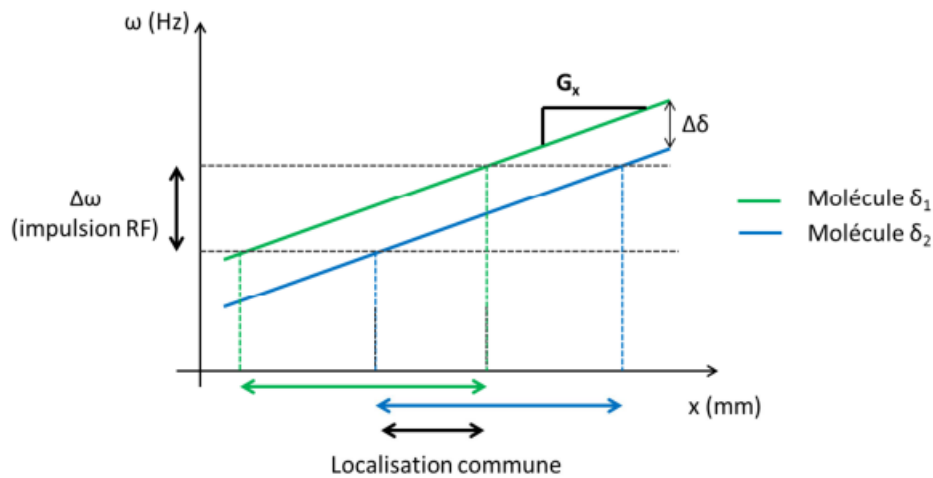
**figure 2-5** : Représentation schématique du bloc LASER. Les gradients de localisation sont en rouge, les gradients de crusher en noir.

L'utilisation de cette séquence permet d'obtenir une très bonne localisation avec les bords du volume d'intérêt bien définis, et un signal maximisé au sein du voxel.

Cependant, les spins de molécules différentes présentent un encodage légèrement différent pour un même gradient de sélection de coupe, ce qui a pour effet d'inclure du signal hors du volume d'intérêt. La différence de déplacement chimique  $\Delta\delta$  entre deux molécules induit alors une erreur de localisation liée au déplacement chimique  $\Delta x$  sur le volume sélectionné sur une coupe d'épaisseur  $E_{\text{coupe}}$

$$\frac{\Delta x}{E_{\text{coupe}}} = \frac{\Delta\delta}{\Delta\omega} \quad (\text{II. 6.3})$$

La figure 2-6 illustre les effets de cet artefact de localisation : si l'on considère deux molécules qui ne résonnent pas à la même fréquence, donc qui ont un déplacement chimique différent, l'impulsion RF va exciter leurs fréquences, mais leurs positions sur l'axe des x ne sera pas la même. En appliquant cet effet selon les trois dimensions de l'espace, l'erreur liée au déplacement chimique induit bien une différence sur le volume choisi.



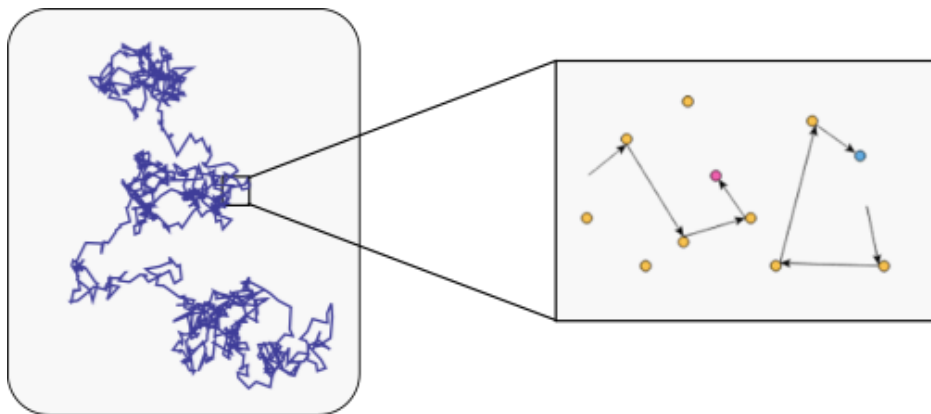
**figure 2-6** : illustration de l'artefact de localisation lié au déplacement chimique. L'impulsion RF excite les fréquences de l'intervalle  $\Delta\omega$ , mais les positions sur l'axe x des deux molécules illustrées ne sont pas les mêmes. Extrait du manuscrit de thèse de Clémence Ligneul (2017).

Afin de diminuer cette erreur, une solution serait d'augmenter la bande passante  $\Delta\omega$  de l'impulsion, donc réduire la durée de l'impulsion, donc augmenter le  $B_1$ , ce qui est limité par le  $B_1$  maximal délivré par les antennes. Si cela peut poser un problème avec l'utilisation d'antennes classiques, nous ne sommes pas limités par cette contrainte avec la crysonde. Les impulsions adiabatiques du bloc de localisation LASER sont centrées sur la résonance de la créatine à 3 ppm et leur bande-passante est réglée à 10 kHz, ce qui conduit à une erreur d'environ 10% pour un déplacement de 2 ppm par rapport à la créatine.

### 3. LE PHENOMENE DE DIFFUSION ET SA MESURE PAR RMN

#### 3.1. La diffusion libre

En 1827, Robert Brown observe l'agitation supposément chaotique de particules dans un fluide (Brown, 1828). Il définit ce qu'on appelle le mouvement brownien comme la description du mouvement aléatoire d'une particule dans un fluide en l'absence de mouvement macroscopique et dont le déplacement est soumis uniquement aux chocs avec les autres particules du milieu environnant (figure 3-1). Ce mouvement n'est pas entravé par des obstacles, on parle donc de diffusion libre.



**figure 3-1** : illustration du mouvement brownien d'une particule dans un fluide.

Au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle, Adolf Fick introduit le coefficient de diffusion  $D$  en modélisant la diffusion comme le mouvement de particules selon un gradient de concentration : le flux de particules est directement proportionnel au gradient de concentration, et le coefficient de proportionnalité est alors le coefficient de diffusion.

Albert Einstein développe au début des années 1900 une théorie mathématique reliant le mouvement brownien et les lois de Fick sur la diffusion. En considérant que les déplacements des particules sont isotropes, c'est à dire qu'ils ont la même probabilité de suivre une direction ou une autre, il modélise le mouvement brownien comme une marche au hasard suivant une distribution gaussienne (Einstein, 1905). La densité de probabilité  $p$  qu'une particule occupe une position  $r$  à l'instant  $t$ , s'exprime alors sous la forme

$$p(r, t|r_0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(\frac{-(r - r_0)^2}{4Dt}\right) \quad (\text{III. 1.1})$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion libre.

La relation d'Einstein-Smoluchowski établit un lien entre  $D$  et la température du fluide  $T$

$$D = \frac{k_B T}{K} \quad (\text{III. 1.2})$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann, et  $K$  le rapport entre la force de frottement  $F$  et la vitesse de la particule  $v$ .

La loi de Stokes définit l'écoulement non-turbulent pour une particule sphérique comme une relation de proportionnalité entre  $F$  et  $v$

$$\vec{F} = -6\pi\eta R\vec{v} \quad (\text{III. 1.3})$$

avec  $\eta$  la viscosité dynamique de la particule.

A partir des équations (III.1.2) et (III.1.3), on peut déduire la relation de Stokes-Einstein, qui montre que  $D$  est directement proportionnel à la température du milieu, et inversement proportionnel au rayon de la particule  $R$  et à la viscosité du fluide

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} . \quad (\text{III. 1.4})$$

Cette relation reste néanmoins très limitée dans son utilisation puisqu'en général, les molécules d'intérêt ne sont pas des sphères.

La diffusion est un processus aléatoire, et les déplacements ont une probabilité équivalente d'avoir lieu dans toutes les directions (on parle de déplacement isotrope), le déplacement moyen des particules ( $x-x_0$ ) est nul. On s'intéresse alors au déplacement quadratique moyen, donné par la relation suivante :

$$\langle (x - x_0)^2 \rangle = \int_x (x - x_0)^2 \times p(x, t|x_0) dx. \quad (\text{III. 1.5})$$

A partir des équations (III.1.1) et (III.1.5), on peut donc estimer le coefficient de diffusion  $D$  à partir du déplacement quadratique moyen et du temps de diffusion  $t$  dans un milieu non contraint dans un espace à trois dimensions :

$$D \cong \frac{\langle (x - x_0)^2 \rangle}{6t} \quad (\text{III. 1.6. a})$$



ou encore le long d'un axe (à une dimension) :

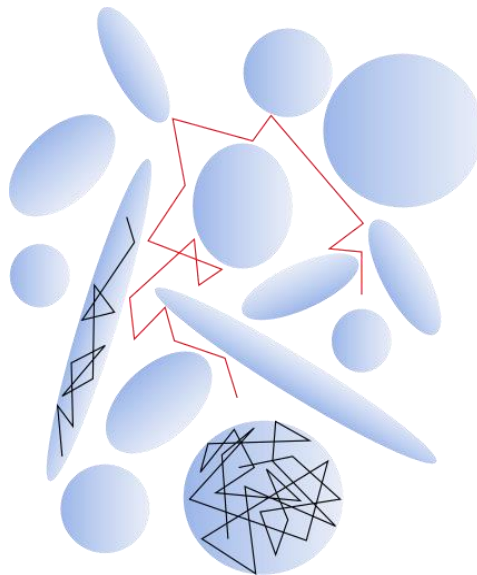
$$D \cong \frac{\langle (x - x_0)^2 \rangle}{2t} . \quad (\text{III. 1.6. b})$$

Cette relation est exacte dans le cas de la diffusion libre. On lira souvent D exprimé en  $\mu\text{m}^2/\text{ms}$  ou encore en  $\text{mm}^2/\text{s}$ .

### 3.2. Diffusion restreinte et tortueuse

Bien que le milieu biologique soit principalement liquide, la diffusion de l'eau et des métabolites n'est pas libre, puisque leur mouvement est entravé par les membranes cellulaires, les protéines...

Lorsque les molécules diffusent dans un espace confiné, comme une sphère par exemple, le coefficient de diffusion tend vers zéro car à partir d'un certain temps de diffusion, tout l'espace a été exploré par les molécules. Il s'agit alors d'une diffusion restreinte.



**figure 3-2** : Illustration de la trajectoire d'une molécule dans un cas de diffusion tortueuse (rouge) et restreinte (noir).

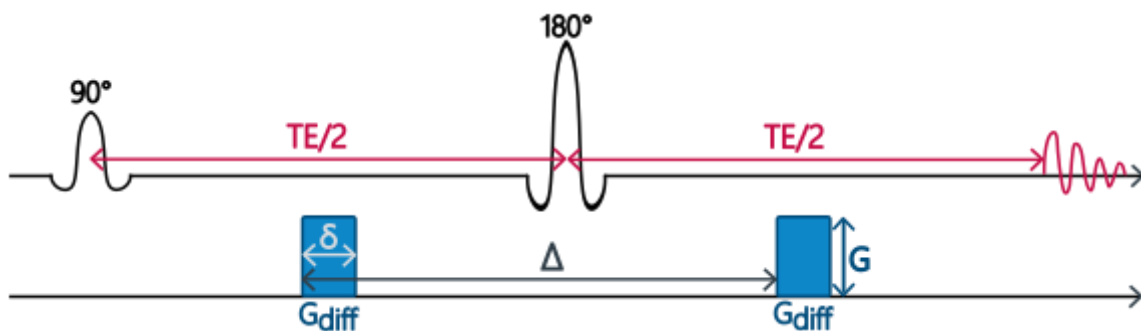
On parle de diffusion tortueuse lorsque le déplacement des molécules est entravé par la présence d'obstacle. L'espace exploré n'est pas borné comme dans le

cas d'une diffusion restreinte, mais il croît moins vite que si la diffusion était libre (figure 3-2).

La diffusion n'est alors plus caractérisée par le coefficient de diffusion libre, mais par le coefficient de diffusion apparent, défini par III.1.6 en fonction du déplacement quadratique moyen et du temps de diffusion, qui varie avec l'environnement et le temps de diffusion  $t_d$ .

### 3.3. La pondération en diffusion et les gradients de diffusion

Les séquences RMN pondérées en diffusion voient le jour en 1965, grâce à la méthode des gradients pulsés, illustrée figure 3-3, de Stejskal et Tanner, ou PGSE pour Pulse Gradient Spin Echo (Stejskal & Tanner, 1965), puis sont appliquées à la diffusion restreinte en 1968.



**figure 3-3** : Séquence simple de Stejskal-Tanner, appelée aussi PGSE, composée d'une impulsion d'excitation à  $90^\circ$  suivie de deux gradients de diffusion pulsés de part et d'autre d'une impulsion de refocalisation à  $180^\circ$ .

Le principe est le suivant : une paire de gradients est incorporée de part et d'autre de l'impulsion de refocalisation dans une séquence d'écho de spin classique. Le premier gradient, placé après l'impulsion d'excitation à  $90^\circ$ , induit une phase pour chaque spin de l'échantillon, dépendante de leur position au sein de l'échantillon. Les spins diffusent pendant un certain temps, puis un second gradient, identique au premier, est appliqué après l'impulsion de refocalisation pour inverser l'encodage de

phase. Ainsi, pour les spins stationnaires, les phases s'annulent parfaitement, mais, si les spins ont diffusé et se sont donc déplacés, leur position finale est différente de leur position initiale et la cohérence de phase n'est pas rétablie par le second gradient de diffusion. Dans ce chapitre, nous nous efforcerons d'expliciter le calcul de la phase acquise par les spins lors d'une séquence de diffusion et l'atténuation du signal macroscopique correspondant.

### 3.3.1. *Approximation des gradients courts*

Lorsque le temps d'application du gradient  $\delta$  est courte devant le temps de diffusion  $\Delta$ , on peut considérer que les spins n'ont pas le temps de diffuser pendant la durée  $\delta$  : il s'agit de l'approximation des gradients infiniment courts. Plaçons-nous dans cette situation.

Après l'application du premier gradient de diffusion d'intensité  $G$ , la phase d'un spin est définie par :

$$\phi(t) = \gamma \int_0^{\delta} \vec{G}(t) \cdot \vec{x} dt . \quad (\text{III. 3.1})$$

Ainsi, si l'on considère la séquence de Stejskal-Tanner (figure 3-3), après l'impulsion d'excitation à  $90^\circ$ , la phase  $\phi_0$  est donnée par  $\phi_0 = \gamma G \vec{x}_0 \delta$ .

Au moment où le second gradient est appliqué, la phase  $\phi_0$  devient  $-\phi_0$  à cause de l'impulsion de refocalisation et les spins des protons ont diffusé jusqu'à une position  $x_1$  qui leur est propre. Ils ont donc une nouvelle phase  $\phi_1 = \gamma G \vec{x}_1 \delta$ .

La phase finale est donc :

$$\Delta\phi = \gamma \delta G (\vec{x}_1 - \vec{x}_0) . \quad (\text{III. 3.2})$$

Le déphasage étant directement lié à l'atténuation du signal mesuré, on en déduit aisément que plus les déplacements quadratiques moyens sont grands, et plus la baisse de signal est importante. Si les protons n'ont pas diffusé, la position de départ est identique à la position finale, soit  $x_1 = x_0$ . La différence de phase est donc nulle et le signal n'a pas diminué.

Le signal  $S$  acquis correspond à la somme des aimantations transverses de chaque spin de l'échantillon (en négligeant la relaxation), et s'exprime donc simplement en fonction

du signal  $S_0$  mesuré sans application de gradients de diffusion :

$$\frac{S}{S_0} = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N e^{i\varphi_p} \quad (\text{III. 3.3})$$

La limite continue est donnée par :

$$\frac{S}{S_0} = \iint_{-\infty}^{+\infty} e^{i\gamma\delta\vec{G}(\vec{x}-\vec{x}_0)} P(\vec{x}|\vec{x}_0) d\vec{x}d\vec{x}_0 . \quad (\text{III. 3.4})$$

Si on considère  $P(\vec{x}|\vec{x}_0)$  comme la densité de probabilité donnée dans l'équation (III.1.1), on peut en déduire l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion dans le cas de la diffusion libre :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta D}, \quad (\text{III. 3.5})$$

que l'on peut également exprimer sous forme logarithmique :

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 D \Delta. \quad (\text{III. 3.6})$$

### 3.3.2. Cas général : les équations de Bloch

Les équations de Bloch-Torrey (Torrey, 1956) permettent de définir l'évolution de l'aimantation transversale pour une diffusion libre et isotrope en négligeant les effets de la relaxation :

$$\frac{\partial M_{xy}(r, t)}{\partial t} = \gamma M_{xy} \times B(r, t) + D \nabla^2 M \quad (\text{III. 3.7})$$

En prenant en compte que  $B(r, t) = B_0 + \mathbf{G}(t) \cdot \mathbf{r}$ , la solution de l'équation (III.3.7) est donnée par :

$$\vec{M}_{xy}(\vec{r}, t) = M_0 e^{-i\left(\int_0^t G(t') dt'\right) \vec{r}} \times e^{-\gamma^2 D \int_0^t \left[\int_0^{t'} \vec{G}(t'') dt''\right]^2 dt'} . \quad (\text{III. 3.8})$$

Au temps d'écho TE, l'intégrale  $\int_0^{TE} G(t') dt$  est nulle. Ainsi, si l'on définit le moment des gradients  $k$  tel que

$$k(t) = \gamma \int_0^t G(t')^2 dt' \quad (\text{III. 3.9})$$

On peut simplifier l'équation (III.3.8) telle que :

$$M_{xy}(r, TE) = e^{-D \int_0^{TE} k(t')^2 dt'} \quad (\text{III. 3.10})$$

Soit b la pondération en diffusion telle que :

$$b = \int_0^t k(t')^2 dt' \quad (\text{III. 3.11})$$

Ainsi, à l'écho, l'atténuation du signal peut donc s'écrire

$$\frac{S}{S_0} = e^{-bD} \quad (\text{III. 3.12})$$

En intégrant III.3.11, Stejskal-Tanner a démontré dès 1965 que  $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 t_d$ , avec  $t_d = \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)$ .

Ainsi :

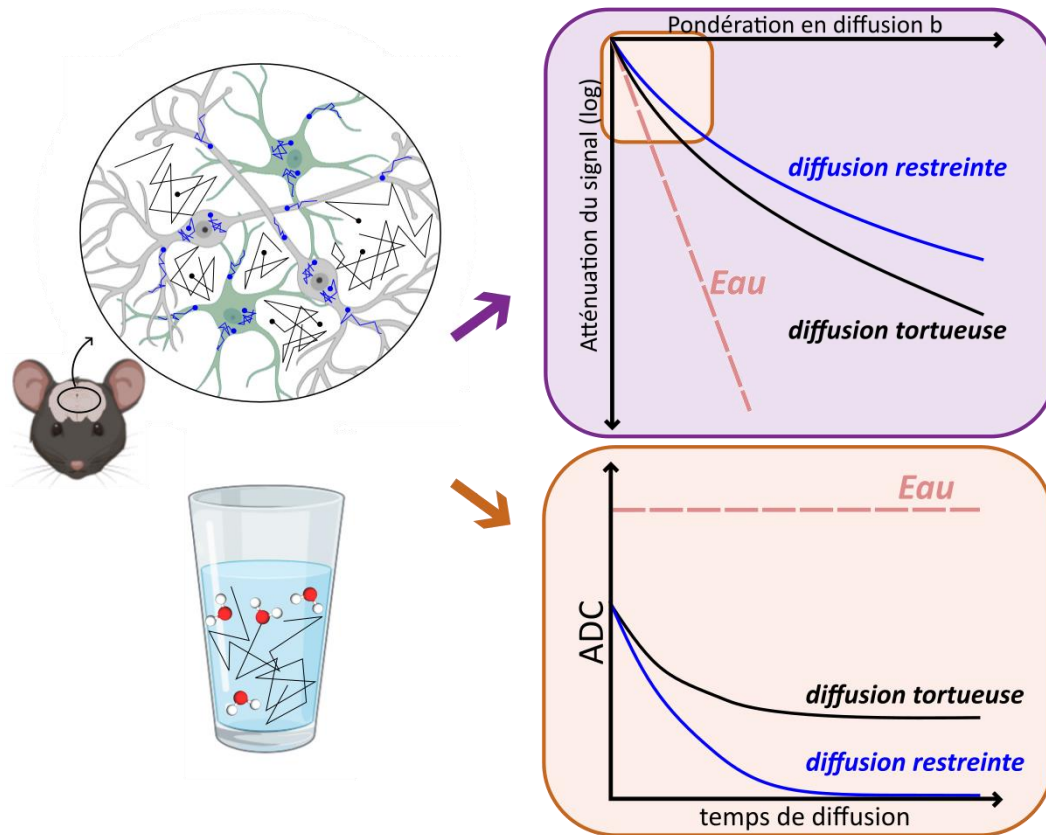
$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \quad (\text{III. 3.13})$$

NB : on retrouve bien l'équation (III.3.6) dans le cas des gradients courts ( $\delta < \Delta$ ).

### 3.4. La diffusion comme biomarqueur de la morphologie cellulaire

Les métabolites sont confinés dans leur espace intracellulaire sur l'échelle de temps de diffusion. En plus de la diffusion encombrée par les organelles intracellulaires, la diffusion des métabolites est donc aussi affectée par la diffusion restreinte causée par les membranes du compartiment cellulaire.

Lorsque la diffusion est libre, comme celle d'une molécule d'eau dans un verre, l'atténuation du signal est mono exponentielle (figure 3-4, encart violet).



**figure 3-4** : illustration de la diffusion restreinte (bleu) et tortueuse (noir) de métabolites dans le cerveau, en comparaison à la diffusion libre de molécules d'eau dans un verre; et l'évolution (haut, violet) de l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion. Dans le cas d'une diffusion libre, le signal s'atténue mono exponentiellement. Plus la diffusion est restreinte et plus l'atténuation du signal va tendre vers un plateau ; et (bas, orange) de leur coefficient de diffusion apparent en fonction du temps de diffusion. Dans le cas de la diffusion libre, l'ADC reste constant. Il diminue dans le cas d'une diffusion tortueuse et tend vers une valeur nulle quand la diffusion est restreinte.

Le coefficient de diffusion tel que défini à partir de la distance quadratique moyenne par les équations III.1.6.a et b, varie avec le temps de diffusion et l'environnement dans lequel les molécules diffusent. On préfère alors parler de coefficient de diffusion apparent, ou ADC. Il s'agit de la moyenne d'ensemble des déplacements des particules. Lorsque la diffusion est libre, l'ADC est constant (figure 3-4, encart orange).

Dans le cas d'une diffusion contrainte, aux faibles valeurs de pondération en

diffusion  $b$ , l'atténuation peut toujours être considérée comme approximativement mono exponentielle (on verra plus bas que, lorsque la valeur de  $b$  augmente, c'est-à-dire lorsque l'on affine la grille d'encodage des déplacements des spins, l'atténuation du signal adopte un comportement qui dévie de la mono exponentialité). En reprenant l'équation (III.3.13), l'ADC se calcule à partir de l'atténuation du signal aux faibles valeurs de  $b$  :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-bADC} \quad (\text{III. 4.1})$$

Ainsi, il suffit en théorie d'acquérir deux points de mesures du signal, à  $b=0$  ms/ $\mu\text{m}^2$  pour  $S_0$ , et l'autre à  $b \neq 0$  ms/ $\mu\text{m}^2$  mais suffisamment peu élevé pour rester dans l'approximation du comportement mono exponentiel.

L'ADC dépend donc du milieu dans lequel les molécules diffusent, mais également du temps de diffusion puisque de nouveaux types d'obstacles, correspondant à des structures à plus longues échelles, apparaissent avec le temps. Pour une molécule diffusant librement, L'ADC sera constant au cours du temps. Cependant, pour une molécule diffusant dans un milieu tortueux, l'ADC diminue avant d'atteindre un plateau, et tend vers zéro avec l'augmentation du temps de diffusion si la diffusion est restreinte, puisque tout l'espace a pu être exploré (la distance quadratique moyenne n'augmente plus) (figure 3-4).

La mesure de l'ADC des métabolites dans le cerveau en fonction du temps de diffusion démontre que les métabolites diffusent dans des longues fibres présentant des structures plus ou moins longues, comme des embranchements, des feuilletts astrocytaires ou des épines dendritiques, et qui influent sur la dépendance au temps de diffusion de l'ADC (Valette et al., 2018). En fonction du temps de diffusion, l'ADC mesuré apporte donc des informations différentes sur le milieu dans lequel les molécules diffusent :

Pour un temps de diffusion très court ( $< 5$  ms), les métabolites n'ont pas le temps de se déplacer suffisamment pour rencontrer des obstacles structurels. L'ADC mesuré se rapproche du coefficient de diffusion libre, et on est donc particulièrement sensible à la viscosité du milieu.

Pour un temps de diffusion « intermédiaire », les métabolites vont parcourir quelques  $\mu\text{m}$ . Cela permet d'être sensible au diamètre des corps cellulaires et au diamètre des fibres (Ligneul & Valette, 2017; Marchadour et al., 2012). Dans ce travail

de thèse, nous ne nous placerons qu'à des temps de diffusion intermédiaire.

Pour un temps de diffusion long (>500 ms), les métabolites explorent une grande partie de l'espace alloué par la cellule (jusqu'à plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$ ). Dans ce cas, la diffusion peut refléter les embranchements et la longueur des fibres cellulaires (Najac et al., 2016; Palombo et al., 2016).

La mesure de l'ADC conduit donc à une mesure indirecte de la géométrie, et peut être utilisé comme un marqueur de la microstructure cellulaire. Cependant, la mesure de l'ADC à différent temps de diffusion est difficile, car le rapport signal-à-bruit devient très faible aux long  $t_d$ , en raison de la relaxation. D'un point de vue pratique expérimentalement parlant, il est aussi nécessaire d'acquérir des spectres sans pondération en diffusion pour chaque  $t_d$ , ce qui rend l'expérience bien plus longue. Enfin, la mesure de l'ADC à différents  $t_d$  n'est pas une mesure des plus précises pour être sensible aux restrictions de la diffusion sur des courtes distances.

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons plutôt au comportement à hautes valeurs de  $b$ , ainsi qu'à un autre type d'encodage : le double encodage en diffusion.

### 3.5. Le Q-space, les hautes valeurs de $b$ , et la sensibilité à la restriction

#### 3.5.1. *Le Q-space*

En 1988, Callaghan et al. montrent que le fait de combiner PGSE et images RMN permet d'imager les déplacements des spins statiques et dynamiques. Le conjugué du déplacement dynamique  $r'-r$  est appelé l'espace  $q$  ( $q$ -space en anglais), tandis que l'espace  $k$  (ou  $k$ -space) correspond lui au conjugué de  $r$  seul. On peut définir le vecteur spatial réciproque  $q$  tel que :

$$q = \frac{\gamma\delta G}{2\pi} . \quad (\text{III. 5.1})$$

Selon l'approche de Callaghan et al., en utilisant  $q$ , l'atténuation du signal est donc directement liée aux probabilités de déplacement selon l'équation suivante et correspond à la transformée de Fourier entre l'intensité de l'écho dans le  $q$ -space et le



déplacement dans l'espace conjugué:

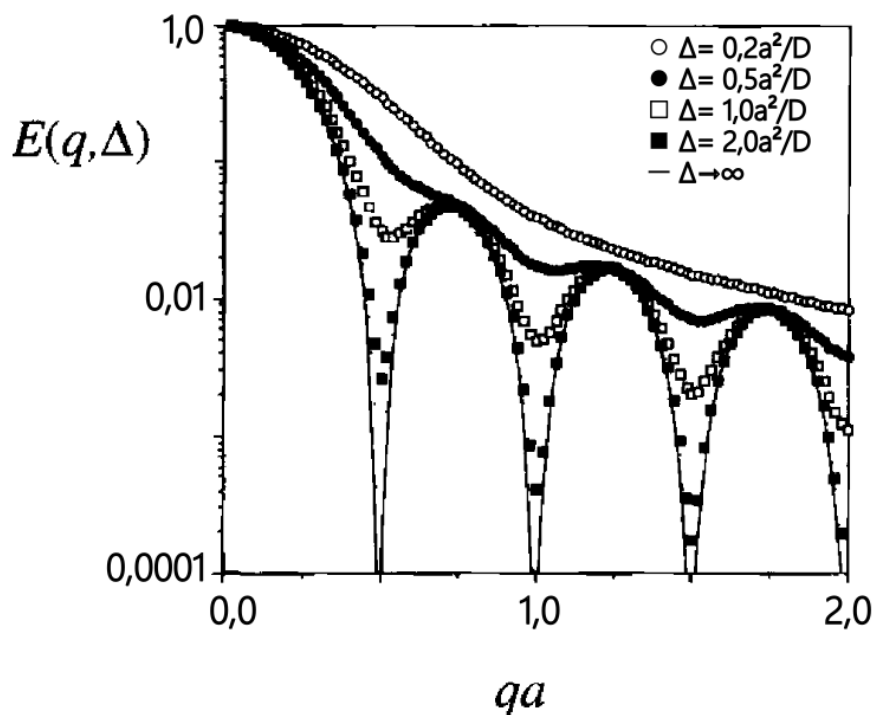
$$E_{\Delta}(q) = \int P_s(R, \Delta) \exp(i2\pi qR) dR \quad (\text{III. 5.2})$$

où  $E_{\Delta}(q)$  représente l'évolution du signal en fonction de  $q$ .

L'imagerie  $q$ -space implique deux contraintes principales ; tout d'abord, l'amplitude des gradients doit être importante, et les gradients doivent être courts car cette relation n'est applicable seulement dans ce cas (King et al., 1994).

Il est donc possible d'extraire, à partir de l'atténuation du signal, des informations structurales d'échantillons pseudopériodiques. En effet, les gradients de diffusion induisent un contraste plus ou moins important en fonction de l'intensité des gradients, contraste directement lié à la restriction dans des structures pseudopériodiques.

Si  $\Delta$  est grand, pour des molécules bloquées dans un compartiment où la diffusion est restreinte à une géométrie particulière, comme une sphère ou un cylindre, la probabilité de déplacement informe alors sur la taille et la forme du compartiment en question (Cohen & Assaf, 2002). Ces paramètres structurels sont en effet reflétés



**figure 3-5** : simulation de l'atténuation de l'écho pour des spins placés entre des plans parallèles séparés par une distance de  $2a$ , pour différentes valeurs de  $\Delta$ . Tiré de Callaghan, 1995

par des pics de diffraction dans l'évolution du signal, comme il l'a déjà été montré dans des matériaux poreux (Callaghan, 1995), et comme illustré figure 3-5. Pour cela, il faut que  $\Delta$  satisfasse la limite au long temps de diffusion, soit  $\Delta \gg a^2/2D$ , où  $a$  est la taille du compartiment dans lequel les molécules diffusent, et  $D$  le coefficient de diffusion.

En 1997, Kuchel et al. étudient la diffusion de globules rouges dans le sang humain et observent le même phénomène de diffraction des molécules d'eau, montrant ainsi que des informations structurelles peuvent également être extraites dans un système hétérogène comme le milieu biologique (Kuchel et al., 1997). Cependant, il est important de noter que les globules rouges sont relativement uniformes, et lorsque l'échantillon est constitué de cellules de tailles différentes, le phénomène de diffraction laisse place à une décroissance d'allure multi-exponentielle (Peled et al., 1999).

### 3.5.2. *Les hautes valeurs de b*

Il est possible de relier les mesures à hautes valeurs de pondération en diffusion  $b$  aux mesures dans le  $q$ -space avec la relation suivante :

$$b = (2\pi q)^2 t_d \quad (I.3.24)$$

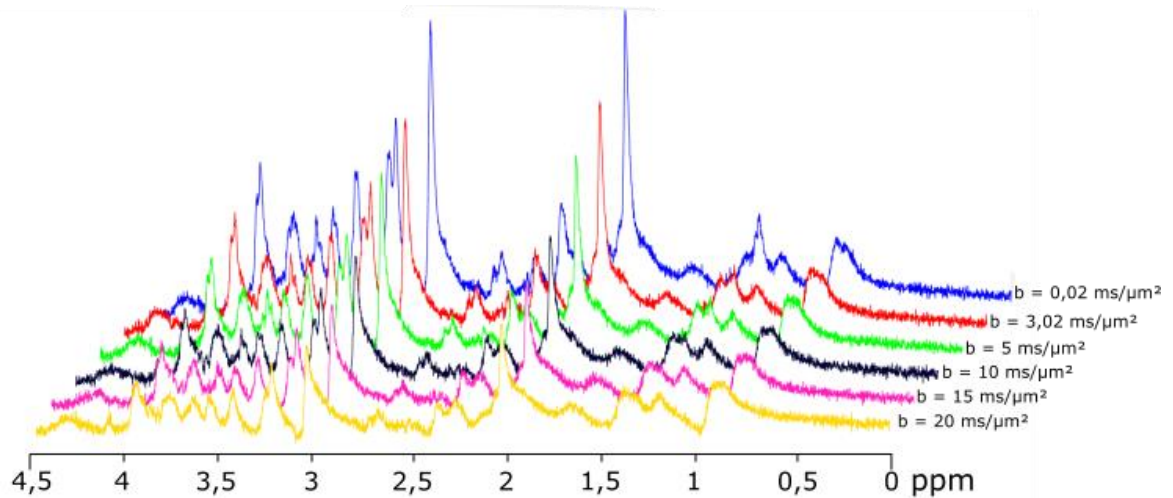
avec  $t_d$  le temps de diffusion effectif,  $t_d = \Delta - \delta/3$  dans le cas de gradients rectangulaires.

De la même façon qu'avec l'imagerie  $q$ -space, une amplitude importante des gradients permet d'atteindre de très hautes valeurs de pondération en diffusion : on effectue alors des mesures aux hautes valeurs de  $b$  (figure 3-6). La grande majorité des résultats présentés dans ce manuscrit ont été acquis avec cette méthode.

Nous pouvons faire un parallèle avec l'imagerie  $q$ -space : plus la pondération en diffusion est élevée, et plus nous sommes sensibles à la restriction. Comme introduit chapitre 3.4, avec l'augmentation des valeurs de  $b$ , l'atténuation du signal s'éloigne du comportement mono-exponentiel propre à la diffusion libre pour se rapprocher d'un comportement multi-exponentiel, synonyme de diffusion encombrée.

Il est donc possible de détecter des modifications structurelles ou de compartimentation métabolique en mesurant l'atténuation du signal de diffusion de métabolites cibles, comme dans le cas de réactivité astrocytaire par exemple (Ligneul et al., 2019). La modélisation des données permet ensuite d'estimer le diamètre des

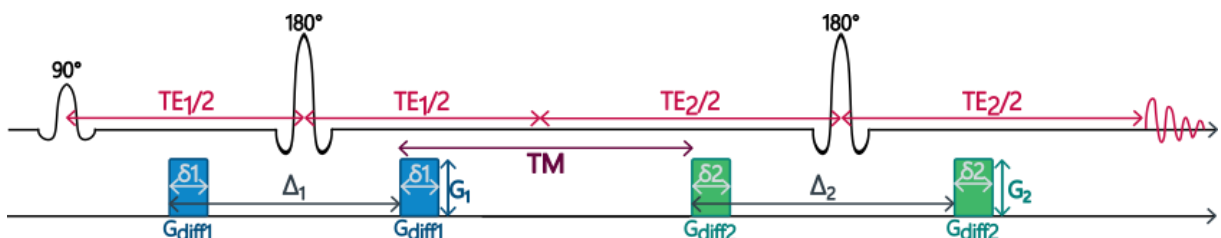
fibres et corps cellulaires (Palombo et al., 2017).



**figure 3-6** : Spectres pondérés en diffusion acquis dans un voxel hippocampal chez la souris à 11,7 T.

### 3.6. Double Encodage en Diffusion (DDE)

Les techniques de mesure de diffusion présentées jusqu'ici sont très utiles pour détecter des modifications structurelles en comparaison d'un modèle à l'autre, mais il reste encore difficile d'interpréter les résultats de façon univoque. En effet, différents modèles biophysiques peuvent expliquer de manière à peu près équivalente l'atténuation du signal mesuré.

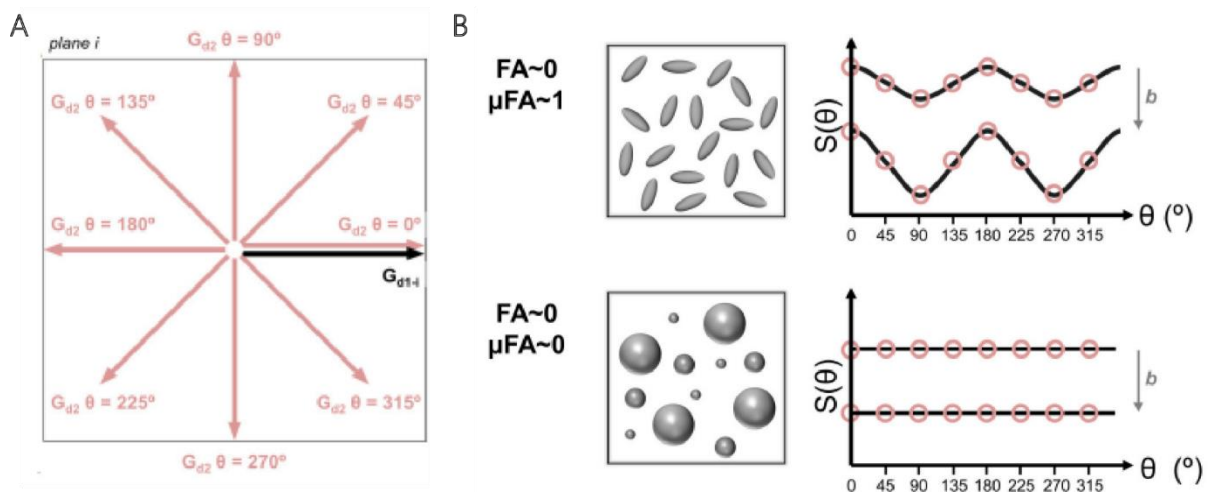


**figure 3-7** : Schéma de la séquence en double encodage en diffusion (DDE). Elle est composée de deux blocs de diffusion qui consistent chacun en le motif de la séquence PGSE de Stejskal-Tanner.

Des séquences plus complexes ont alors été suggérées dans les années 1990, avec de multiples impulsions, pour caractériser la microstructure d'un système poreux, (Callaghan & Xia, 1991; Cheng & Cory, 1999), puis ont été généralisées par Mitra en 1995. Ces séquences consistent en la répétition du motif de la PGSE de Stejskal-Tanner. Dans le cadre de la séquence en double encodage en diffusion, ou DDE, qui est la plus courante et celle que nous utilisons dans ce manuscrit, il s'agit de deux paires de gradients de diffusions successives, séparées par un délai appelé temps de mélange, ou TM. Le temps de mélange joue un rôle important dans ces séquences puisqu'il permet d'introduire une autre variable temporelle pour sonder l'échantillon. Cette séquence est illustrée sur la figure 3-7.

On peut la retrouver dans la littérature plus ancienne sous différents acronymes, comme DWV pour double wave vector, d-PFG pour double pulse field gradient (et tous les dérivés), mais le nom de la séquence a été standardisé à DDE pour double diffusion encoding (Shemesh et al., 2016).

Bien que les paramètres puissent varier d'un bloc de diffusion à l'autre, on retrouve en règle générale dans la littérature les mêmes temps de diffusion  $t_d$  et valeurs de  $b$  entre les deux blocs.



**figure 3-8** : **A**. Illustration des directions des gradients de diffusion dans la séquence DDE. La direction du premier groupe  $G_{d1}$  est fixe (noir) et la direction du second groupe  $G_{d2}$  (rose) tourne par pas de  $45^\circ$  dans un plan incluant  $G_{d1}$ . **B**. Illustration schématique de la modulation du signal en fonction de l'angle  $\theta$ , attendue en fonction d'un environnement anisotrope (haut) ou isotrope (bas), pour deux valeurs de  $b$ . Extrait de Lundell et al., 2021.

L'idée de cette séquence est de modifier la direction relative entre chaque paire de gradient, de façon à décrire un angle  $\theta$  qui varie entre  $0^\circ$  et  $360^\circ$ , ou  $0^\circ$  et  $180^\circ$ , au

cours de l'expérience (figure 3-8.A.) ; le but étant d'être sensible à l'anisotropie microscopique due aux membranes cellulaires.

En 1995, Mitra montre en effet qu'un long temps de mélange permet de différencier les compartiments isotropes de ceux anisotropes. Dans ces derniers, le signal est maximal pour les configurations 0 et 180°, et minimal pour les configurations à 90° (modulo  $\pi$ ), tandis que dans un compartiment isotrope, le signal reste relativement peu modulé. Ces résultats sont illustrés figure 3-8.B. Il a également été montré, grâce à des acquisitions en DDE puis en modélisant les résultats, que la DDE est particulièrement sensible au nombre d'embranchements des fibres plus qu'au diamètre et longueur de ces fibres (Vincent et al., 2020) et surtout, que la signature de l'espace extracellulaire est très différente de l'intracellulaire car plus plate (Vincent et al., 2021)

Dans ce travail de thèse, nous effectuons des mesures à hautes valeurs de  $b$ , ainsi qu'en DDE. Ces mesures, complémentaires l'une de l'autre, permettront de mieux cerner les propriétés de diffusion des différents compartiments. Nous espérons ainsi pouvoir les distinguer clairement les uns des autres. Enfin, l'utilisation des deux techniques permettrait d'obtenir une modélisation plus robuste, bien qu'encore trop peu détaillée ni précise. Nous verrons chapitre 6 qu'elle peut néanmoins être suffisante dans le cas du lactate.

### **4. METHODES EXPERIMENTALES**

#### **4.1. Set-up et protocole expérimental**

##### *4.1.1. IRM 11,7 T et sa crysonde*

Les expériences réalisées tout au long de ce travail de thèse ont été effectuées sur souris, à l'aide d'un scanner IRM 11,7 T Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne). Il s'agit d'un aimant préclinique horizontal, dédié à l'imagerie du rongeur, dont les gradients peuvent atteindre une amplitude maximale de 752 mT/m en un temps de montée de 100  $\mu$ s. L'interface utilisateur fonctionne sous Paravision 6.0.1.

Chaque expérience a été réalisée à l'aide d'une antenne  $^1\text{H}$  surfacique cryogénique en quadrature de phase en transmission réception pour souris. Cette antenne transmet un champ  $B_1$  très intense à proximité de l'antenne mais également très inhomogène. Elle est refroidie à l'hélium liquide, ce qui permet de diminuer le bruit thermique de l'antenne, et améliore le rapport signal sur bruit d'un facteur d'environ 3 par rapport à une antenne de surface non refroidie.

##### *4.1.2. Expérimentation animale*

###### *Mise en place de l'animal*

La souris est anesthésiée à l'aide d'isoflurane, un gaz volatil anesthésiant. L'induction se fait par inhalation de gaz constitué d'un mélange air/dioxygène ( $\text{O}_2$ ) et de 4,5% d'isoflurane. L'animal est ensuite installé dans un lit adapté à l'utilisation de la crysonde. La tête est fixée par trois points fixes à l'aide d'un cadre stéréotaxique composé d'un mors et de barres d'oreilles qui seront insérées dans chaque conduit auditif. L'immobilisation de la souris est une étape cruciale, puisque le moindre mouvement de tête peut perturber de façon drastique les mesures effectuées. Un anesthésiant local est appliqué dans les oreilles avant la mise en barres d'oreilles et la concentration d'isoflurane est diminuée progressivement jusqu'à 1%. Le mélange air/ $\text{O}_2$ /isoflurane est acheminé tout au long de l'expérience jusqu'à un masque dans

lequel respire l'animal.

La respiration est surveillée en continu via un capteur mécanique placé sous l'abdomen de la souris, et est maintenue entre 60 et 120 respirations par minute. Une sonde endorectale permet également de surveiller la température tout au long de l'expérience. Afin de maintenir une température constante chez l'animal, un pad chauffant est placé sur le corps et la queue de la souris, le lit est chauffé par circuit d'eau chaude, et l'antenne cryogénique est à 37°C au niveau de la tête de la souris.

D'un point de vue expérimental, il est important de maintenir la température constante puisque la fréquence de résonance de l'eau et la diffusion étant sensibles à la température, une variation de température peut provoquer des biais de mesures. En effet, entre 20 et 40°C et à pH physiologique, la fréquence de résonance du NAA est stable (Cady et al., 1995; Corbett et al., 1995), tandis que celle de l'eau varie de 0,01 ppm/°C (Hindman, 1966; Muller & Reiter, 1965), ce qui correspond à environ 5 Hz/°C à 11,7 T. Une température stable permet donc d'éviter une dérive fréquentielle entre les métabolites et l'eau.

### *Effet de l'anesthésie*

Dans les études sur le métabolisme cérébral, le choix de l'anesthésique est crucial puisqu'il va plus ou moins influencer sur le métabolisme et ce de différentes façons. Bien qu'il existe de nombreux anesthésiques différents, on rencontre souvent les mêmes produits dans la littérature. En règle générale, dans la catégorie des anesthésiques volatiles, l'isoflurane est le plus populaire, tandis que la médétomidine sera plus généralement utilisée lorsque l'on recherche un anesthésique injectable.

L'isoflurane est un agent anesthésique gazeux, majoritairement préféré pour sa simplicité d'utilisation. Son utilisation est également compatible avec des expériences relativement longues (jusqu'à 4 heures). Cependant, il est également connu pour ses effets vasodilatateurs et son impact sur le métabolisme, en particulier sur la concentration de lactate (Boretius et al., 2013; Kulak et al., 2010; Valette et al., 2007).

Afin de s'affranchir de cet effet, que l'on retrouve pour tous les anesthésiques volatiles (Horn & Klein, 2010), nous avons souhaité utiliser un anesthésique injectable, le domitor, dont le principe actif est la médétomidine. Ce produit est connu pour favoriser la vasoconstriction (Varga Smith, 2023), et est souvent utilisé en voie sous-cutanée ou intraveineuse.

Une fois la souris immobilisée dans le lit, et endormie sous isoflurane, une ligne de perfusion est placée en sous-cutanée dans le bas du dos de l'animal, le plus loin possible de l'antenne. Un bolus de 0,3 mg/kg de médétomidine est injecté, et une infusion continue de 0,6 mg/kg/h débute dix minutes plus tard. Pendant ce temps, la concentration d'isoflurane est diminuée progressivement, jusqu'à l'arrêt total d'isoflurane.

Nous avons souhaité comparer les effets de la médétomidine couplée à l'isoflurane sur la concentration des métabolites principaux. Des spectres de métabolites ont donc été acquis pour différentes conditions d'anesthésie, sans bloc de diffusion, avec une séquence LASER uniquement, dans un voxel cortical de 15  $\mu$ L. Nous avons effectué les mesures 20 minutes après chaque modification de conditions d'anesthésie afin de s'assurer que les changements métaboliques ont eu le temps de s'établir.

Les spectres acquis sont montrés figure 4-1 : Le spectre rouge représente la condition sous médétomidine (domitor) sans isoflurane, tandis que le noir correspond à la condition sous isoflurane uniquement. Le pic de lactate à 1,31 ppm est à peine perceptible sans isoflurane, tandis qu'il est bien plus intense lorsque la concentration d'isoflurane est à 1,5%, sans médétomidine.

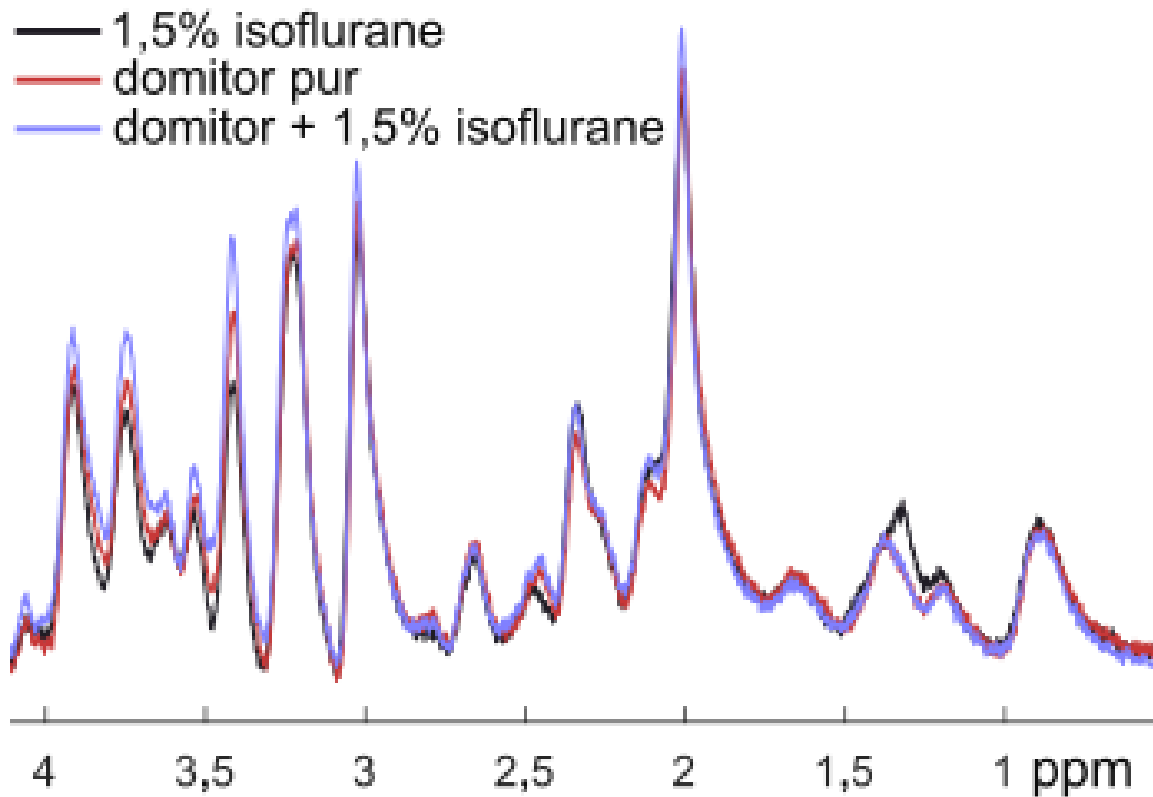
Le spectre violet représente la condition sous médétomidine avec une augmentation de concentration d'isoflurane à 1,5%. On constate que le pic de lactate n'est pas plus visible dans cette condition d'anesthésie que sous médétomidine uniquement, suggérant une possible inhibition de production de lactate par la médétomidine, ou une consommation immédiate de lactate par le métabolisme.

On constate également que, sous médétomidine, l'intensité du signal du NAA augmente avec la médétomidine, et encore plus lorsque l'on couple la médétomidine à 1,5% d'isoflurane. L'intensité des pics correspondant aux résonances du glucose entre 3 et 4 ppm augmente de façon similaire, ce qui est cohérent avec l'effet hyperglycémique induit par la médétomidine et reporté dans la littérature (Kanda & Hikasa, 2008)

L'intensité du pic de lactate sous médétomidine est très peu visible même sans pondération en diffusion. L'intensité du signal diminuant lorsqu'on augmente la pondération en diffusion, il sera difficile dans ces conditions d'effectuer des mesures à hautes valeurs de b pour le lactate. Pour cette raison, et bien que ce ne soit pas l'agent



idéal, nous avons décidé de conserver l'isoflurane comme anesthésique, en veillant à effectuer toutes nos mesures dans les mêmes conditions, soit sous 1% d'isoflurane.



**figure 4-1** : Spectres de métabolites acquis avec la séquence LASER, pour différentes conditions d'anesthésie chez la même souris : sous 1,5 % d'isoflurane (noir), avec médétomidine uniquement (rouge) et avec médétomidine et 1,5% d'isoflurane (violet).

#### 4.1.3. *Protocole expérimental*

En pratique, une fois l'animal installé dans l'aimant, une expérience de diffusion débute par l'accord de la crysonde (« wobble ajustement »), puis par l'acquisition d'une carte de  $B_0$  pour le réglage des shims de premier et de second ordres. Les shims de premier ordre sont de nouveau réglés, cette fois de manière itérative, dans le voxel d'intérêt. Un contrôle de la largeur à mi-hauteur du pic de l'eau permet de s'assurer des bonnes conditions de l'expérience (animal stable, voxel bien placé dans le cerveau). Un pic de l'eau déformé ou trop large ( $> 18-20$  Hz) est souvent synonyme d'un voxel placé trop proche du bord du crâne, donc parasité par de l'os ou autres tissus, ou de mouvement de la tête de l'animal.

Afin d'obtenir un maximum de signal, les spectres sont acquis en séries de 16 à 32 répétitions individuelles, pour un total de 128 ou 256 acquisitions pour chaque

valeur de pondération en diffusion (hautes valeurs de  $b$ ) ou d'angle (DDE), en fonction de la taille du voxel. Plus le voxel est petit, et plus il sera nécessaire d'accumuler les spectres. Le nombre de spectres par série est choisi de façon à ce que la durée d'une acquisition ne dépasse pas les cinq minutes. En effet, afin de contrer la dérive fréquentielle de l'aimant, un réajustement en fréquence est incorporé toutes les cinq minutes environ, entre deux séries d'acquisitions. On s'assure également de reshimer toutes les 15 à 20 minutes environ.

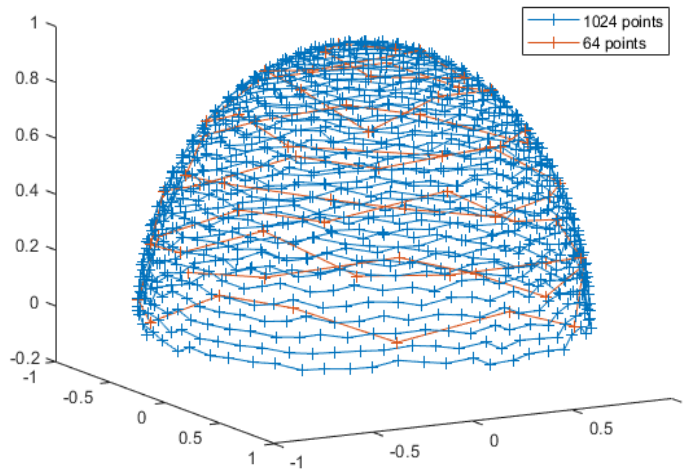
## **4.2. S'affranchir de l'anisotropie et des dérives temporelles**

Dans une optique d'amélioration de précision des séquences, nous avons modifié les séquences que nous utilisons pour les mesures à hautes valeurs de  $b$  et en DDE de façon à s'affranchir d'une éventuelle anisotropie du voxel et des éventuels biais temporels liés à une dégradation du signal au cours du temps.

### *4.2.1. Contrer l'anisotropie avec le powder averaging*

Avec pour objectif de contrer l'anisotropie macroscopique du voxel dans lequel les acquisitions sont faites, nous avons implémenté en cours de thèse un module de « powder averaging », qui modifie la direction des gradients pour chaque répétition. Les directions sont calculées par un module Bruker (initialement utilisé par la méthode DTI) en fonction du nombre de répétitions de façon à couvrir une demi-sphère de façon homogène (figure 4-2).

De cette façon, au lieu d'être toujours orientés selon une seule et unique direction, les gradients ont une direction différente à chaque répétition.

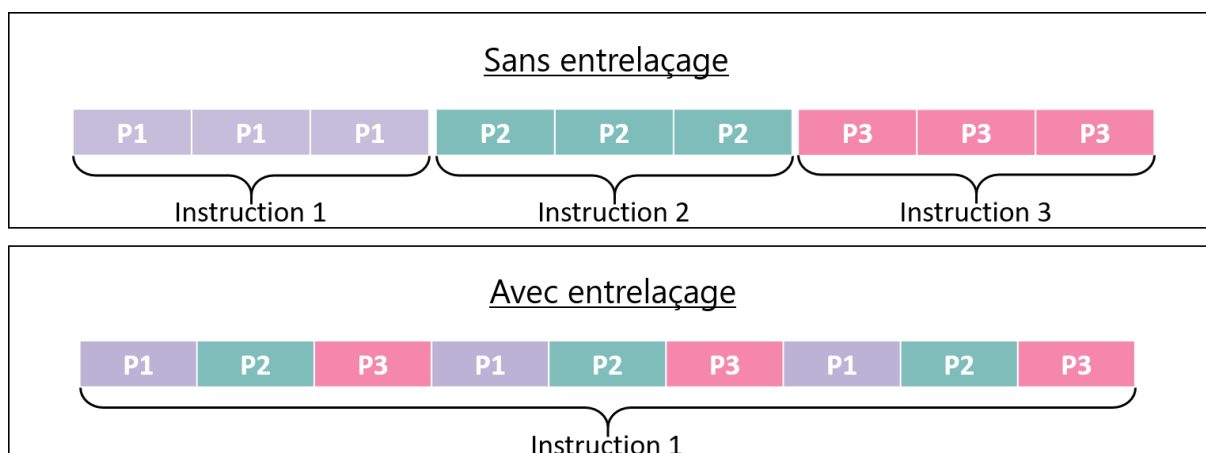


**figure 4-2** : Illustration de la direction des gradients donnés par le module Bruker dans le cadre du powder averaging pour : (bleu) 1024 répétitions et (rouge) 64 répétitions.

#### 4.2.2. *L'entrelaçage des acquisitions pour s'affranchir des dérives temporelles*

Afin de maximiser le rapport signal sur bruit des spectres, et en particulier aux plus hautes valeurs de pondération en diffusion, nous acquérons un grand nombre de répétitions qui sont ensuite sommées en post processing. Le temps d'acquisition étant assez long, il est important de s'affranchir d'une éventuelle dérive temporelle du signal. Habituellement, l'ordre d'acquisition des paramètres est modifié manuellement au sein de chaque série. Cependant, ce type de correction peut s'avérer insuffisant en fonction de la durée des séries, et cette méthode reste chronophage.

Pour pallier cela, nous avons modifié la séquence de façon à entrelacer les différentes valeurs de pondération en diffusion. Ainsi, pendant 4 minutes, au lieu d'acquérir un certain nombre de spectres pour une seule valeur du paramètre que nous avons choisi de mesurer (dans notre cas  $b$  pour les mesures à hautes valeurs de  $b$ ,  $\theta$  pour les mesures en DDE), nous pouvons acquérir le même nombre de spectres, mais réparti entre toutes les valeurs du paramètre en question. Un schéma explicatif de cette modification est proposé figure 4-3.



**figure 4-3** : Schéma explicatif d'une expérience où l'on effectue trois séries de mesures selon trois valeurs du paramètre P, avec et sans acquisitions entrelacées. Avec entrelaçage, une seule instruction permet d'acquérir ce que l'on obtient avec trois (ou plus) instructions sans l'implémentation de cette fonction.

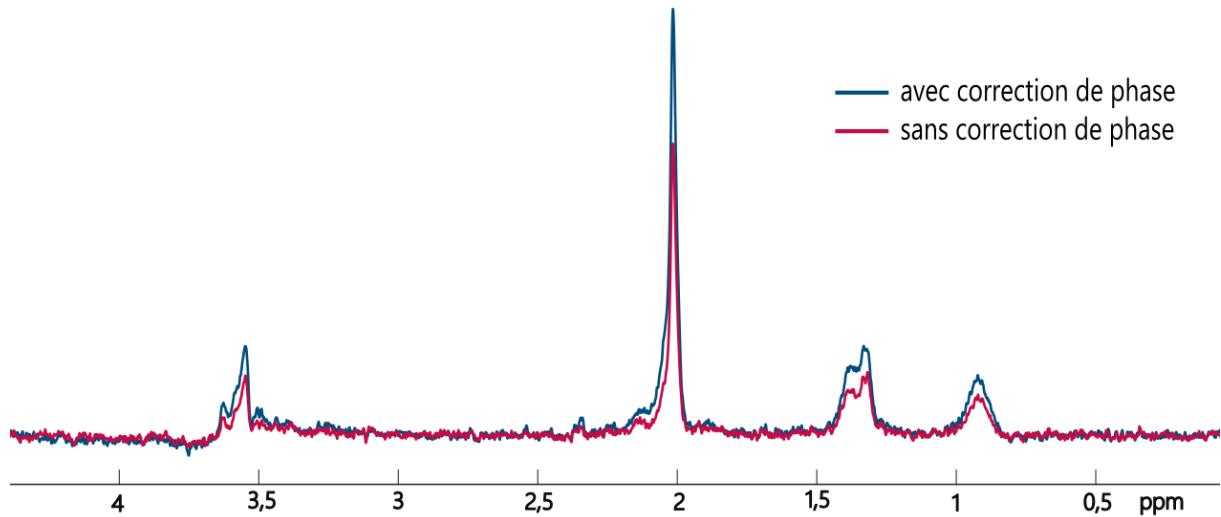
### 4.3. Traitement des données

#### 4.3.1. *Rephasage individuel et somme*

Pour chaque mesure, 128 à 256 spectres sont acquis par blocs d'acquisitions. Les spectres sont ensuite rephasés et recalés en fréquence individuellement sous Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA), puis sommés, tout cela afin d'obtenir un rapport signal sur bruit maximal. Cette étape du post processing est particulièrement importante, d'autant plus lorsque l'on augmente la pondération en diffusion. En effet, comme on peut le constater sur la figure 4-4, la perte de signal est significative si l'on n'applique pas ce rephasage. On notera l'allure inhabituelle des spectres présentés ici, due à l'impulsion utilisée pour les acquisitions. Cette impulsion, qui sera détaillée chapitre 5, a été générée pour ne sélectionner que les résonances du NAA à 2,02 ppm, du myo-inositol à 3,56 ppm, du lactate à 1,31 ppm, et des macromolécules à 0,9 ppm.

Chaque bloc, ou série, de 16 ou 32 acquisitions se voit donc recalé en phase et en fréquence. La moyenne des spectres non recalés sert de référence sur laquelle se base une fonction de coût qui minimise la différence entre le spectre de référence et le spectre à recalé autour de la résonance du NAA, dont l'intensité est la plus

importante. Les spectres sont ensuite sommés un à un. Les séries subissent de nouveau un recalage en phase et en fréquence avant d'être sommées entre elles, ce qui aboutit à la formation du spectre final.



**figure 4-4** : Exemple de spectres acquis avec la séquence SE-LASER polychromatique à  $b=10$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ , reconstruits à partir de 128 répétitions, avec (bleu) et sans (rouge) recalage en phase.

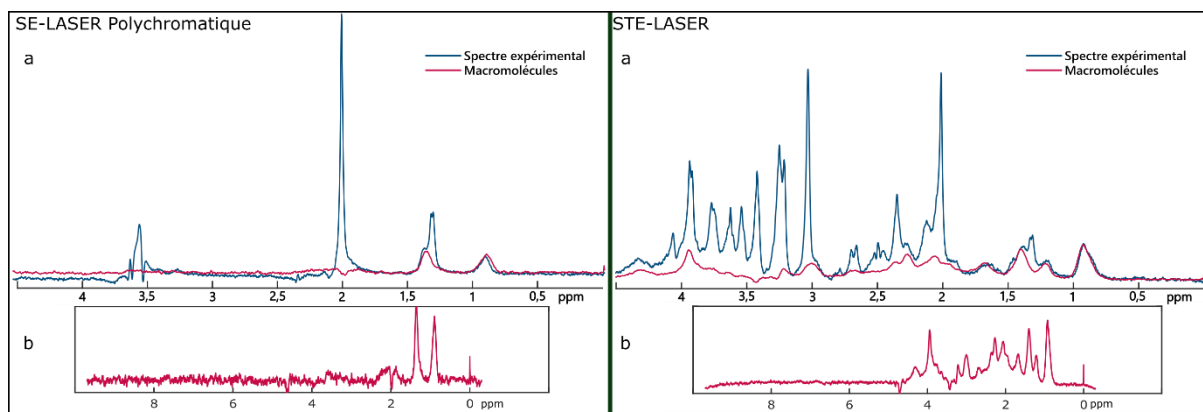
#### 4.3.2. *Les macromolécules, pourquoi, comment ?*

##### *Pourquoi acquérir des spectres de macromolécules ?*

Lors des acquisitions des spectres de métabolites, le signal des macromolécules est également acquis, et contribue ainsi au spectre pondéré en diffusion. Les macromolécules sont de larges molécules peu mobiles, possédant un  $T_2$  très court qui induit un minimum de dix résonances qui se superposent à celles des autres métabolites, ce qui peut conduire à une quantification biaisée. C'est notamment le cas au niveau du lactate, dont la résonance à 1,31 ppm se superpose à une résonance des macromolécules. Parmi ces résonances, certaines sont caractérisées par un couplage  $J$ , en particulier entre les résonances à 0,9 ppm et 2,05 ppm, et entre celles à 1,72 ppm et 3 ppm, ce qui peut expliquer les différences entre les spectres en fonction des séquences utilisées.

Les macromolécules présentent néanmoins l'intérêt d'être peu mobiles, et l'intensité de leur signal diminue peu avec la pondération en diffusion. Elles constituent donc un contrôle pour la mesure de l'atténuation du signal.

Afin de quantifier de façon précise les métabolites, des spectres de macromolécules sont donc acquis expérimentalement sur chaque animal (cf. plus bas), et une base de macromolécules est créée pour la quantification (figure 4-5). Cette étape d'acquisition est importante puisqu'elle permet une quantification très fiable.

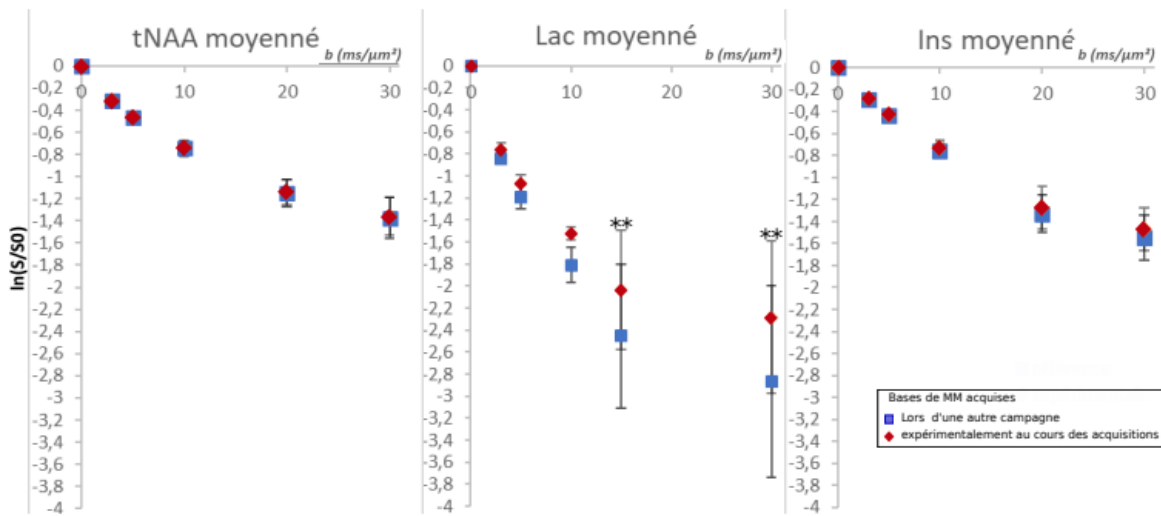


**figure 4-5** : a. Spectres acquis sans pondération en diffusion avec les séquences SE-LASER polychromatique et STE-LASER. b. Bases de macromolécules incluses dans le fit.

En effet, durant mon stage de master 2, nous avons pu comparer sur quatre séries de mesures les données obtenues avec une base de macromolécules acquise lors d'une autre campagne d'expériences et les données obtenues avec la base acquise expérimentalement sur les mêmes animaux, avec la séquence STE-LASER (Ligneul et al., 2017a). Les résultats sont présentés figure 4-6.

Alors que les valeurs mesurées pour le *myo*-inositol et le NAA total ne varient pas en fonction de la base utilisée, on constate que, dans le cas du lactate, une perte de signal significativement plus importante est mesurée. En effet, la résonance du lactate étant flanquée de part et d'autre par des macromolécules, et l'intensité du signal du lactate étant très faible comparée au NAA et au *myo*-inositol, le signal peut rapidement être masqué par celui des macromolécules, en particulier aux hautes pondérations en diffusion.

Il est donc intéressant de noter qu'une base acquise expérimentalement sur le même lot d'animaux utilisés pour mesurer les spectres pondérés en diffusion permet d'obtenir un meilleur fit et une quantification plus précise que si l'on avait utilisé une base acquise lors d'une autre campagne de mesures. Ainsi, pour chaque animal étudié, nous avons acquis un spectre de macromolécules, au début ou à la fin des mesures.

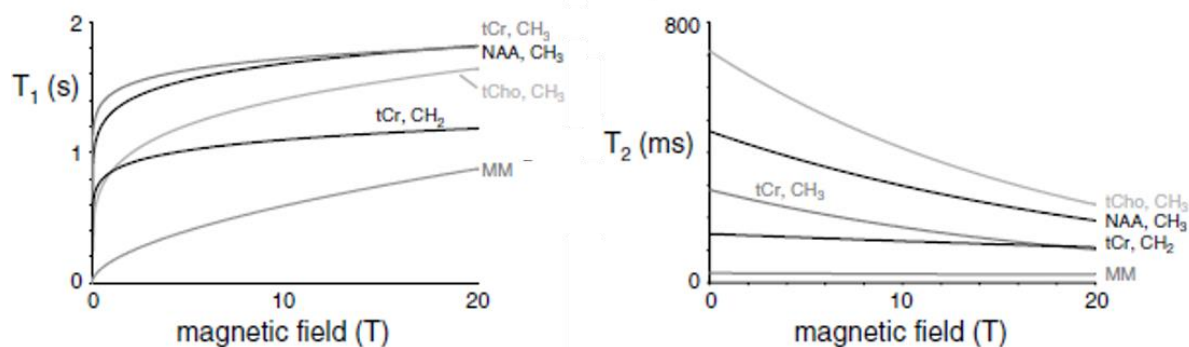


**figure 4-6** : Atténuations du signal acquises avec la séquence STE-LASER dans un voxel hippocampal (63  $\mu\text{L}$ ) moyennées sur 3 animaux et mesurées pour le NAA, le lactate, et l'inositol, avec une base de macromolécules acquise lors d'une autre campagne d'expériences (carrés bleus) expérimentalement (losanges rouges), en fonction des valeurs de  $b$ .

#### L'acquisition des spectres

En règle générale, les spectres de macromolécules sont acquis à l'aide d'une séquence dite d'inversion récupération, ou IR, qui peut être simple ou double (Cudalbu et al., 2021). Cette technique est basée principalement sur le fait que le  $T_1$  des métabolites est presque deux fois plus long que celui des macromolécules (figure 4-7). L'aimantation est totalement inversée, et le temps d'inversion TI est choisi de façon à ce que la contribution des métabolites soit minimale.

Au laboratoire, nous utilisons la technique de double inversion récupération (dIR), qui contient deux impulsions d'inversion donc deux TI différents. Avec cette méthode, l'aimantation des métabolites est proche de zéro, alors que le court  $T_1$  des macromolécules conduit à une récupération de signal bien plus importante. Cette méthode permet donc d'annuler le signal des métabolites, menant ainsi à une observation sélective des résonances des macromolécules (de Graaf, 2007). Cependant, l'application d'une telle méthode diminue fortement le SNR puisque l'aimantation des macromolécules n'a pas atteint un retour à l'équilibre.



**figure 4-7** :  $T_1$  et  $T_2$  de métabolites et des macromolécules en fonction du champ magnétique. Extrait de de Graaf, 2007

Puisque les macromolécules ont un temps de diffusion 10 à 20 fois plus lent que celui des autres métabolites cérébraux (Pfeuffer et al., 2000), nous combinons cette technique à une pondération en diffusion de  $10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Cela permet d'obtenir un signal de macromolécules peu affecté tout en supprimant les résidus de métabolites (Ligneul et al., 2017a). Pour obtenir une base de macromolécules de bonne qualité, il est nécessaire d'acquérir l'équivalent d'au moins 1 heure d'acquisition répartie sur les animaux de l'étude. En pratique, l'acquisition de macromolécules au cours d'une expérience la rallonge d'environ 20 minutes.

#### 4.3.3. *LCModel*

Une fois les étapes de traitement effectuées sous Matlab, les spectres sont quantifiés sous LCModel (Provencher, 1993). Il s'agit d'un logiciel permettant de quantifier la contribution relative des différents métabolites, à partir d'une base. Cette base peut être acquise expérimentalement via des fantômes, mais elle peut également être générée sous Matlab par simulation de l'opérateur densité, en fonction de la séquence utilisée et des TE et TM appliqués. La base de macromolécules acquise expérimentalement est incorporée à cette base de métabolites.

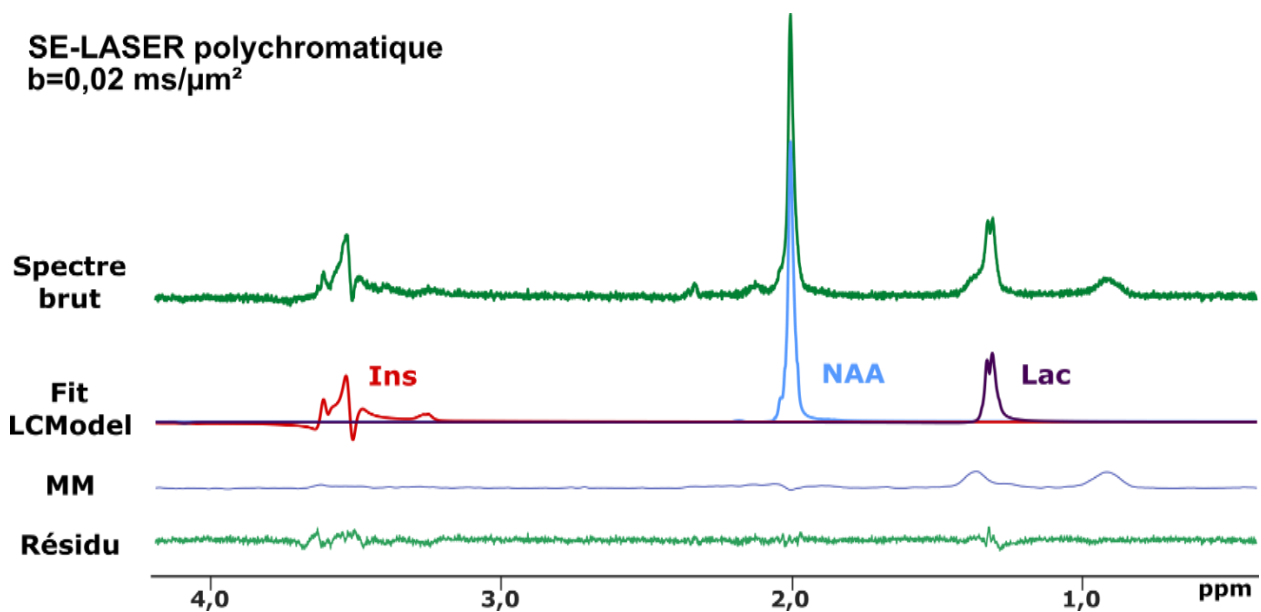
Les métabolites inclus dans la base sont les suivants : l'acétate (Ace), l'alanine (Ala), l'aspartate (Asp), la choline (cho), la créatine (Cr), l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), le glucose (Glc), la glutamine (Gln), le glutamate (Glu), la glycerophosphorylcholine (GPC), le glutathion (GSH), le *myo*-inositol (Ins), le *scyllo*-inositol (sIns), le lactate (Lac), le N-acétylaspartate (NAA), l'acide N-acétylaspartylglutamique (NAAG), la phosphorylcholine (PCho), la phosphocréatine



(PCr), la taurine (Tau) et la phosphatidyléthanolamine (PE).

Nous préférons en général regrouper certains métabolites, dont la quantification peut ne pas être fiable en raison de leur faible concentration ou de la difficulté de discerner les différentes résonnances. Il s'agit du tNAA (NAA + NAAG), tGlu (Glu + Gln), tCho (GPC + PCho + Cho) et tCr (Cr + PCr). Pour juger de la fiabilité de la quantification, nous considérons que les valeurs des bornes de Cramér-Rao (Cramér-Rao lower bounds, CRLB) ne doit pas excéder 5%.

Enfin, bien que LCModel soit un outil de quantification puissant, il est nécessaire et indispensable d'inspecter visuellement la qualité du fit, en contrôlant principalement le fit des macromolécules, la ligne de base, et la position et l'allure du pic de NAA, normalement à 2 ppm. Un exemple de décomposition de spectres obtenus avec LCModel à partir des spectres et bases de macromolécules présentés figure 4-5 pour la SE-LASER polychromatique est montré figure 4-8.



**figure 4-8** : Exemple de décompositions spectrales obtenues avec LCModel à partir des spectres présentés figure 4-5

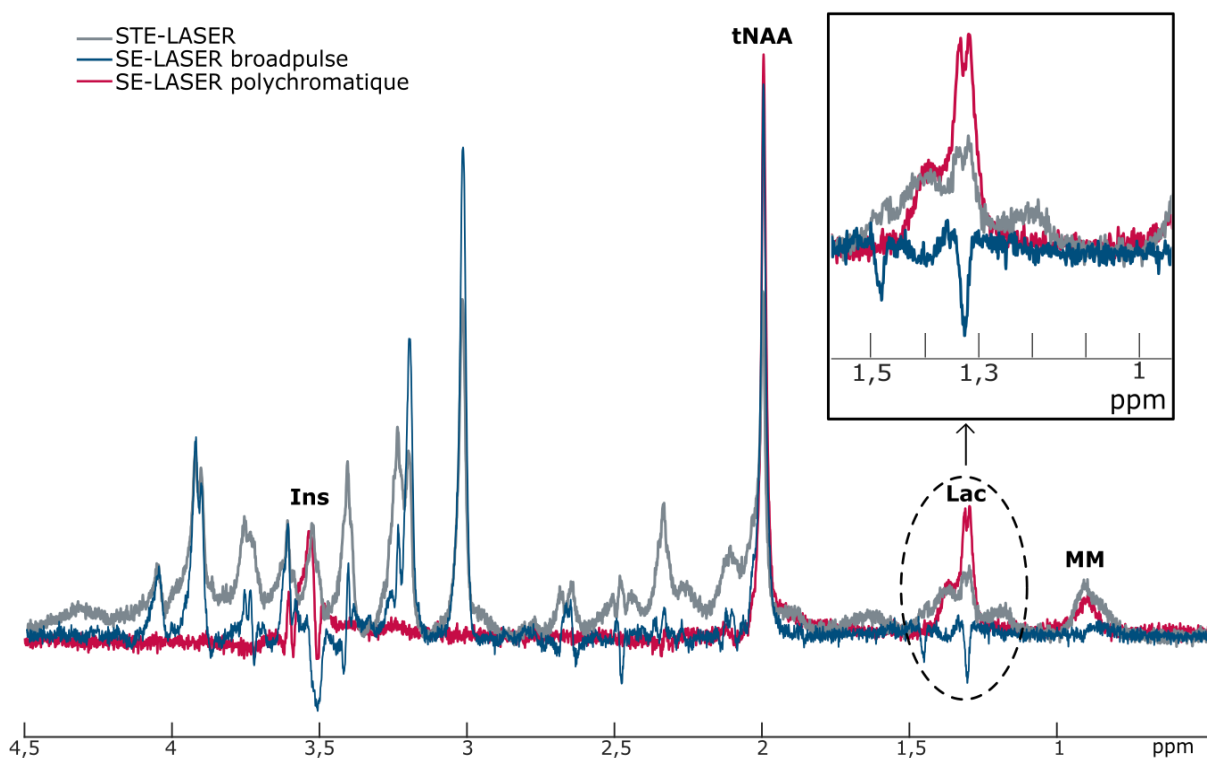
## 5. DIFFERENTES SEQUENCES POUR DIFFERENTES ACQUISITIONS

Le signal du lactate étant peu intense, il est important de choisir soigneusement les impulsions utilisées pour chaque technique d'acquisition afin de maximiser le rapport signal sur bruit et ainsi arriver à une précision de mesure la meilleure possible. Dans ce chapitre, nous évoquons le cheminement qui nous a conduit à l'utilisation préférentielle des séquences et impulsions présentées pour ce travail de thèse.

### 5.1. Mesures aux hautes valeurs de $b$ , ou simple encodage en diffusion (SDE)

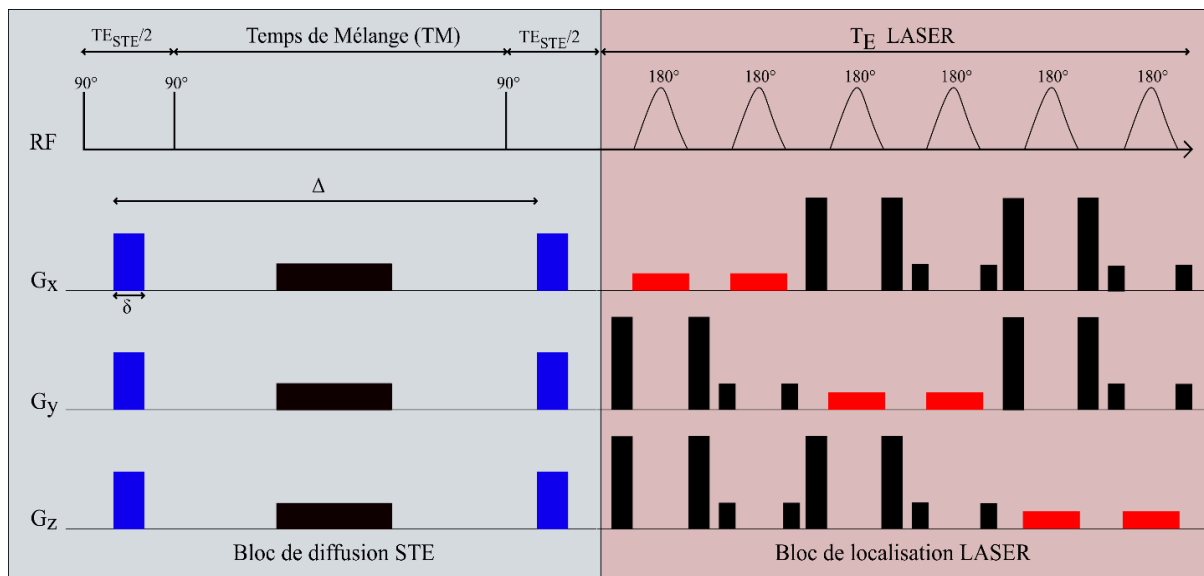
#### 5.1.1. Effet du couplage $J$ et comment s'en affranchir

Comme évoqué chapitre 2.5, lorsque l'on utilise une impulsion de refocalisation classique de type « broadpulse », les effets de la  $J$  modulation sur le pic de lactate le déforment, comme on peut le voir figure 5-1 avec le spectre bleu, rendant le lactate difficile à quantifier, en particulier à hautes valeurs de pondération en diffusion.



**figure 5-1** : spectres acquis sans pondération en diffusion avec trois impulsions différentes. Effet du couplage  $J$  sur le lactate visible dans l'encart

La séquence utilisée habituellement par l'équipe, qui permet de pallier ce problème en réduisant le TE, est la séquence STE-LASER (Ligneul et al., 2017b), qui consiste en un bloc de pondération en diffusion en écho stimulé (STE) suivi d'un bloc de localisation LASER (figure 5-2). On retrouve dans le bloc de diffusion STE une impulsion créneau très courte ( $t = 0,1$  ms) qui crée une première excitation large bande, afin d'obtenir une aimantation transversale. Pendant le temps  $TE_{STE}/2$ , un gradient de diffusion de durée  $\delta$  est appliqué pour déphaser les spins. Ensuite, l'impulsion classique de  $180^\circ$  qu'on trouverait dans une séquence d'écho de spin est remplacée par deux impulsions à  $90^\circ$  séparées par un temps de mélange TM. La première de ces deux impulsions permet de replacer l'aimantation utile le long de  $B_0$ . Les métabolites diffusent pendant TM, puis la seconde impulsion est appliquée pour basculer de nouveau l'aimantation dans le plan transversal, et le même gradient de diffusion est appliqué.



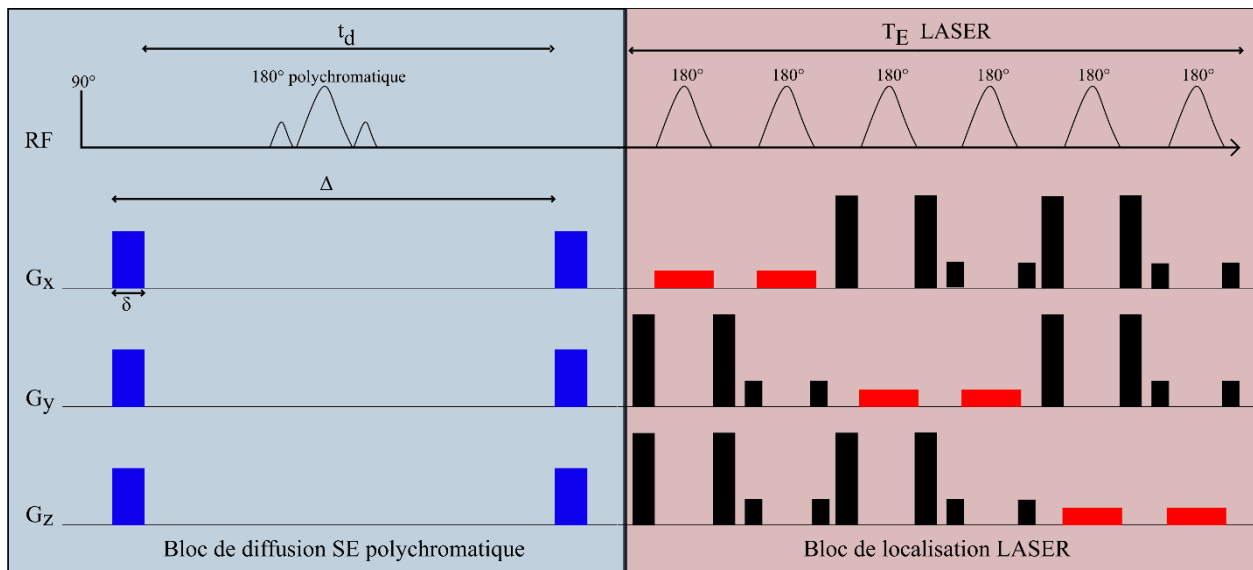
**figure 5-2** : Chronogramme de la séquence STE-LASER. A gauche en gris le bloc de diffusion d'écho stimulé (STE), et à droite en rouge le bloc de localisation LASER. Les gradients de diffusion sont en bleu, les gradients de localisation en rouge, et les gradients de crusher en noir.

L'aimantation est donc stockée le long de  $B_0$  durant le temps de diffusion, pendant lequel l'aimantation relaxe selon  $T_1$ . L'avantage de cette approche en écho stimulé est donc d'avoir un temps d'écho très court (8 ms) indépendamment du temps de diffusion, puisqu'il suffit de faire varier le temps de mélange. Un temps d'écho court permet d'éviter la perte de signal par relaxation  $T_2$ , et surtout permet de s'affranchir des effets de J-modulation, comme illustré par l'encart de la figure 5-1. On constate que l'application d'un écho stimulé (spectre gris) permet de limiter l'effet de la J-

modulation sur le pic de lactate : par rapport à l'application d'un écho de spin broadpulse (spectre bleu), le pic n'est plus inversé et son signal est plus intense. Cependant, l'utilisation d'un écho stimulé résulte en la perte de la moitié de l'aimantation. Ainsi, comme on peut le constater en comparant les spectres obtenus avec les séquences STE-LASER et SE-LASER (figure 5-1), en particulier au niveau du pic correspondant au NAA, le pic obtenu avec la STE-LASER (en gris) est presque deux fois moins intense que le pic obtenu avec la SE-LASER (bleu ou rose).

### 5.1.2. Séquence sélective, avantages et limites

Il serait donc intéressant d'utiliser une approche écho de spin tout en supprimant le couplage J sur une résonance en particulier, en refocalisant uniquement la résonance d'intérêt. Ainsi, pour le lactate, si l'on utilise un bloc de diffusion d'écho de spin où l'impulsion de refocalisation est appliquée uniquement sur la résonance du CH<sub>3</sub> à 1,3 ppm (et pas sur celle du CH<sub>2</sub> à 4,1 ppm), les effets du couplage J sont annulés, comme on peut le voir figure 5-1 avec le spectre rose.

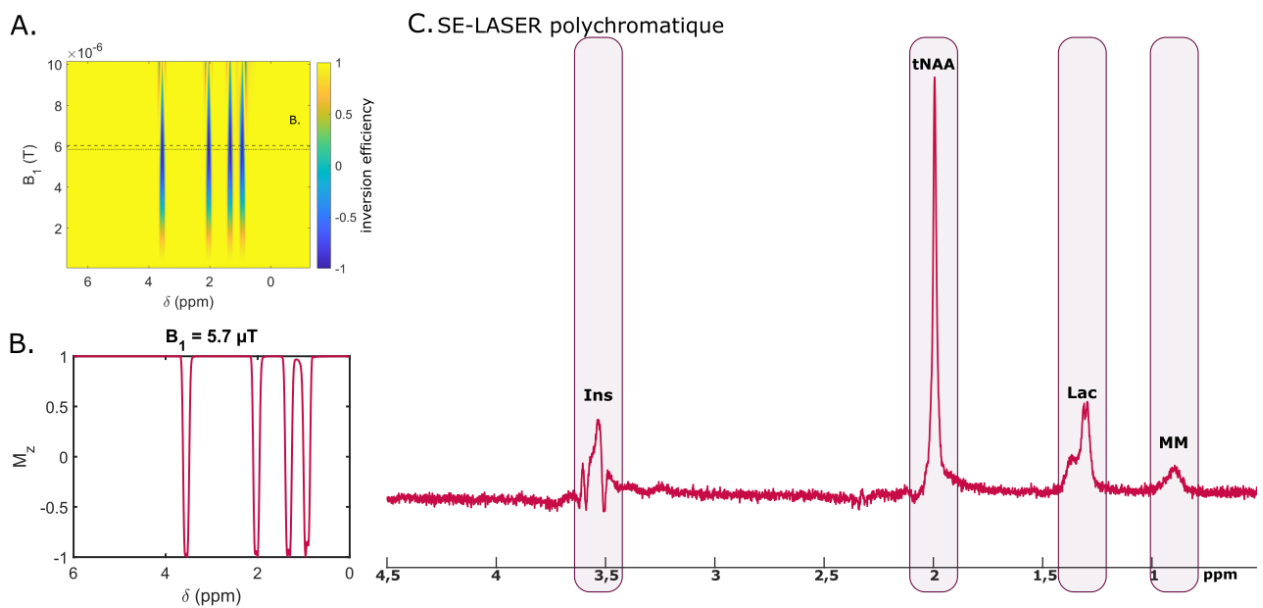


**figure 5-3** : Chronogramme de la séquence SE-LASER polychromatique. A gauche en bleu le bloc de diffusion d'écho de spin (SE), et à droite en rouge le bloc de localisation LASER. Les gradients de diffusion sont en bleu, les gradients de localisation en rouge, et les gradients de crusher en noir.

La séquence d'écho de spin est décrite figure 5-3 et repose sur une impulsion large bande de 90° suivie d'une impulsion de refocalisation sélective polychromatique de

180°. Cette impulsion est générée en utilisant l'algorithme de Shinnar-Leroux (Pauly et al., 1991), en sommant dans l'espace complexe quatre impulsions élémentaires à quatre fréquences différentes : 3,5 ppm pour le *myo*-inositol, 2 ppm pour le NAA, 1,31 ppm pour le lactate, et 0,9 ppm pour les macromolécules. La durée de l'impulsion est de 50 ms pour une bande passante élémentaire de 78 Hz (Mougel et al., 2022), et est détaillée figure 5-4. Il est important de noter que nous avons choisi de refocaliser la résonance à 0,9 ppm des macromolécules : en effet, le pic de lactate à 1,31 ppm se superposant à un pic de macromolécule, afin d'obtenir une quantification fiable du lactate, il est nécessaire d'estimer convenablement la contribution des macromolécules au spectre de métabolites.

Comme on peut le voir figure 5-4, les bandes passantes sont très étroites, et il en résulte un spectre sur lequel seuls les métabolites d'intérêt, à savoir le *myo*-inositol, le NAA et le lactate, ainsi que les macromolécules, sont visibles. Le pic de lactate à 1,31 ppm est exempt de J modulation.



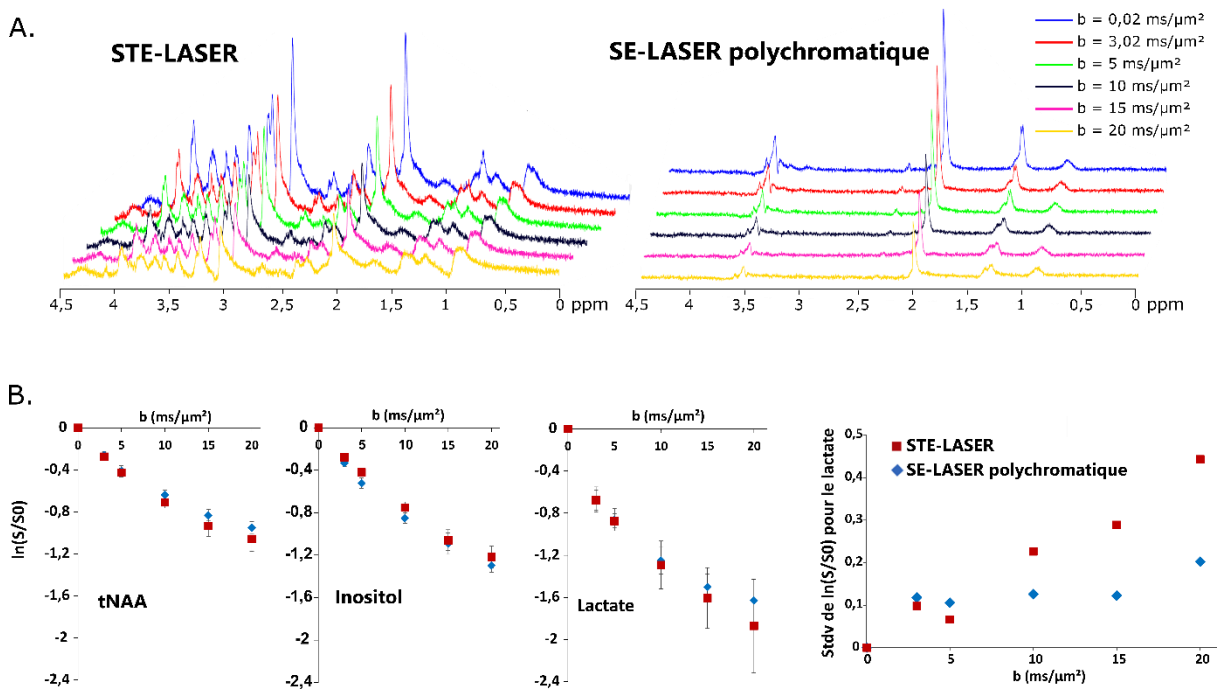
**figure 5-4** : A. Performance de l'impulsion "polychromatique" évaluée par des simulations de Bloch en fonction du déplacement chimique  $\delta$  et de  $B_1$ . B. Profil fréquentiel pour un  $B_1$  optimal de 5,7  $\mu\text{T}$  et C. Spectre de métabolites obtenu avec la séquence SE-LASER polychromatique. Les résonances refocalisées par l'impulsion sont surlignées. Adapté de Mougel et al., 2022

Le travail de mon stage de master 2 consistait à mesurer l'efficacité de la SE-LASER polychromatique, comparée à la STE-LASER dans des mesures à hautes valeurs de

pondération en diffusion. Les résultats ont été présentés au 29<sup>ème</sup> congrès de l'ISMRM et au 5<sup>ème</sup> congrès de la SFRMBM en 2021.

Pour chaque animal, des mesures de diffusion à hautes valeurs de  $b$  ont été réalisées en utilisant la séquence SE-LASER polychromatique puis la séquence STE-LASER. Les timings des différents blocs de diffusion ( $TE_{SE} = 58,3$  ms pour la SE-LASER et  $TE_{STE}/TM = 8,4/50$  ms pour la STE-LASER) ont été choisis afin d'obtenir un temps de diffusion identique ( $t_d = 53,2$  ms). Les données ont été acquises sur quatre souris sauvages (WT) dans un voxel hippocampal de  $7 \times 1,5 \times 3$  mm<sup>3</sup>.

On a pu observer un signal presque deux fois plus intense pour le NAA et le lactate par rapport aux les spectres obtenus avec la STE-LASER (figure 5-1). L'amplitude du signal de l'inositol reste relativement inchangée, et le signal des macromolécules à 0,9 ppm est plus faible avec l'impulsion sélective comparé à la STE, ce qui peut être expliqué par le  $T_2$  court des macromolécules (Mougel et al., 2022).

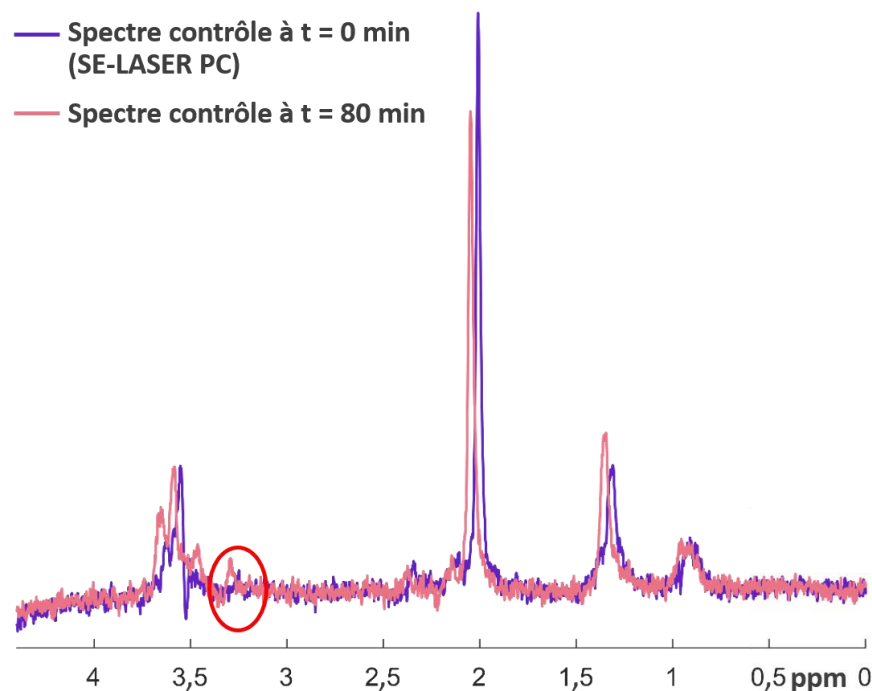


**figure 5-5** : Jeux de données acquis expérimentalement pour différentes valeurs de  $b$  dans un voxel hippocampal de 31,5  $\mu$ L. B. Atténuation du signal pour le NAA, l'inositol, et le lactate en fonction de  $b$  et déviation standard du signal du lactate en fonction de  $b$ .

L'atténuation du signal en fonction de  $b$  (figure 5-5-B) présente un profil assez similaire pour les deux séquences, mais la déviation standard est plus importante pour

la STE-LASER que pour la SE-LASER et augmente exponentiellement avec  $b$ . Ceci peut être justifié par la perte de signal induite par la séquence STE-LASER, rendant les mesures plus incertaines. L'utilisation de la séquence SE-LASER avec suppression du couplage  $J$  montre donc une bien meilleure précision à hautes valeurs de  $b$ .

Cependant, cette impulsion génère des bandes passantes très étroites, qui nécessitent un champ  $B_0$  très stable. Lorsque l'on compare des spectres sans pondération en diffusion acquis au début de l'expérience (figure 5-6, violet), et 80 minutes plus tard (rose), on constate, malgré des shims et recalages en fréquence réguliers, un décalage en fréquence, probablement dû à une petite dérive de la température, au niveau des pics des métabolites d'intérêt, conduisant à une perte de signal pour le NAA. L'inositol voit son profil être drastiquement déformé, et l'apparition d'un pic à 3,3 ppm, souligné par le cercle rouge, indique que l'impulsion ne refocalise plus les résonances souhaitées.



**figure 5-6** : spectres acquis sans pondération en diffusion au début de l'expérience (violet) et 80 minutes plus tard (rose). Le décalage en fréquence de l'impulsion est visible par l'apparition d'un pic (rond rouge) à une fréquence normalement non excitée par l'impulsion.

Malgré des avantages très intéressants pour l'étude de la diffusion du lactate, l'instabilité de cette impulsion sélective est une limite trop importante et nécessiterait le développement d'une nouvelle impulsion, regroupant les avantages de l'impulsion

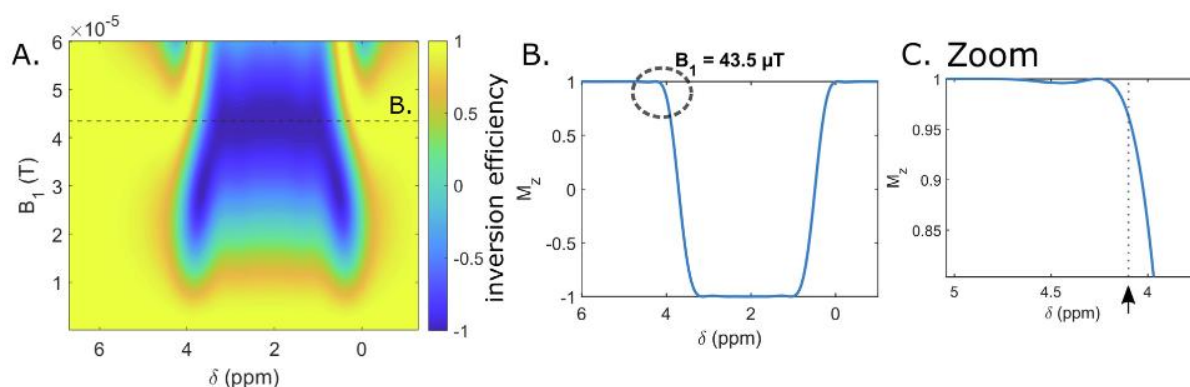
sélective et la stabilité de l'écho stimulé. La table 5-1 résume les avantages et limites de chaque technique présentée.

	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Séquence à écho stimulé STE-LASER	Très bonne localisation + stabilité TE très court = pas d'effet de couplage J ni de relaxation $T_2$	Perte de la moitié du signal
Séquence d'écho de spin SE-LASER broadpulse	Pas de perte d'aimantation (comparé à la STE)	Effets du couplage J + relaxation $T_2$
Séquence d'écho de spin SE-LASER polychromatique	Pas de perte d'aimantation (comparé à la STE) Pas d'effets de couplage J	Impulsion très instable (bandes passantes étroites)

**table 5-1** : tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes séquences et impulsions utilisées. La SE-LASER polychromatique est la plus intéressante, mais son instabilité la rend non suffisante

### 5.1.3. Impulsion « long single band »

Afin de s'affranchir de la limite de l'instabilité de l'impulsion polychromatique, nous avons souhaité générer une impulsion large bande unique (LSB, pour « long single band »), présentant une large bande passante et refocalisant toutes les résonances de 0,1 à 4 ppm.



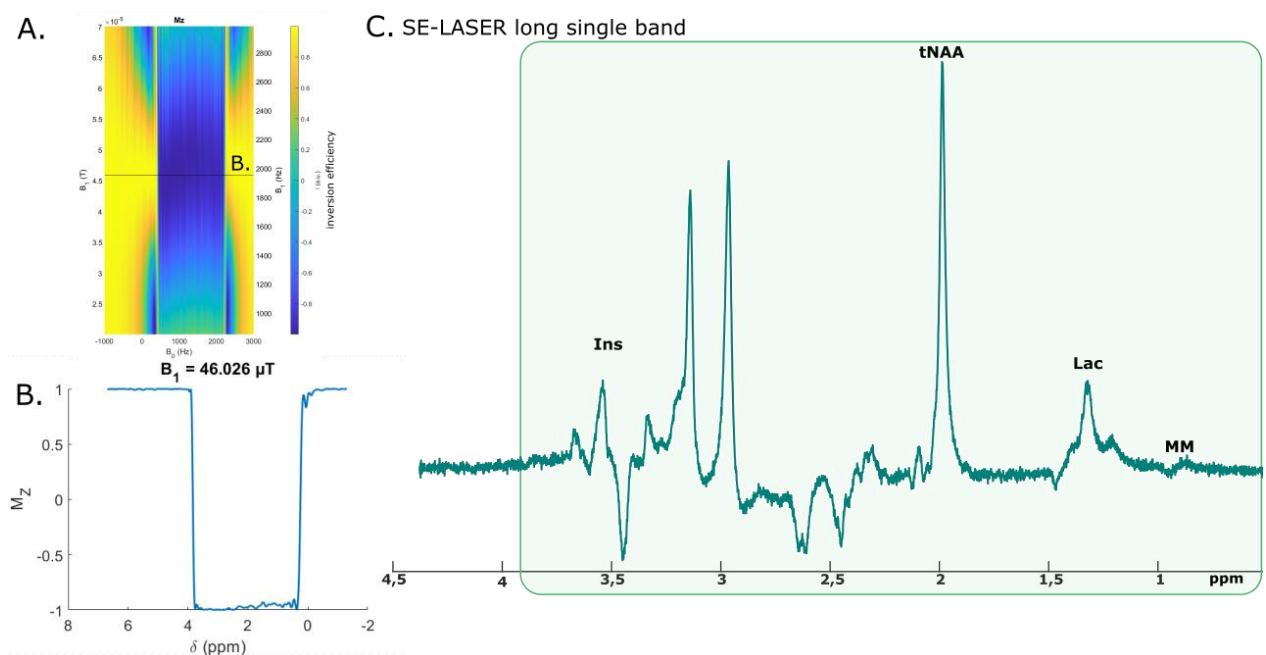
**figure 5-7** : A. Performance de l'impulsion "single band" évaluée par des simulations de Bloch en fonction du déplacement chimique  $\delta$  et de  $B_1$ . B. Profil fréquentiel pour un  $B_1$  optimal de 43,5  $\mu T$  et C. Zoom sur le "pied" du profil, montrant un effet très modéré à 4,1 ppm, où résonne le lactate. Tiré de Mougel et al., 2022



Une telle impulsion avait déjà été générée au sein de l'équipe par Eloïse Mougel (Mougel et al., 2022) avec l'algorithme de Shinnar-Leroux également, dans une optique d'obtenir une impulsion sélective très courte ( $t = 5$  ms). Cependant, la durée de l'impulsion rendait son profil non optimal : comme on peut le constater sur la figure 5-7, les bords du profil ne sont pas nets, ce qui provoque une légère refocalisation de la résonance du lactate à 4,1 ppm, et une déformation du pic de *myo*-inositol, puisque trop près du bord de l'impulsion, rendant la quantification par LCMoDel peu précise.

Nous avons souhaité générer une impulsion équivalente, mais dont la durée (50 ms) permettrait d'obtenir un profil très net, et donc de s'affranchir de ces effets de mauvaise refocalisation.

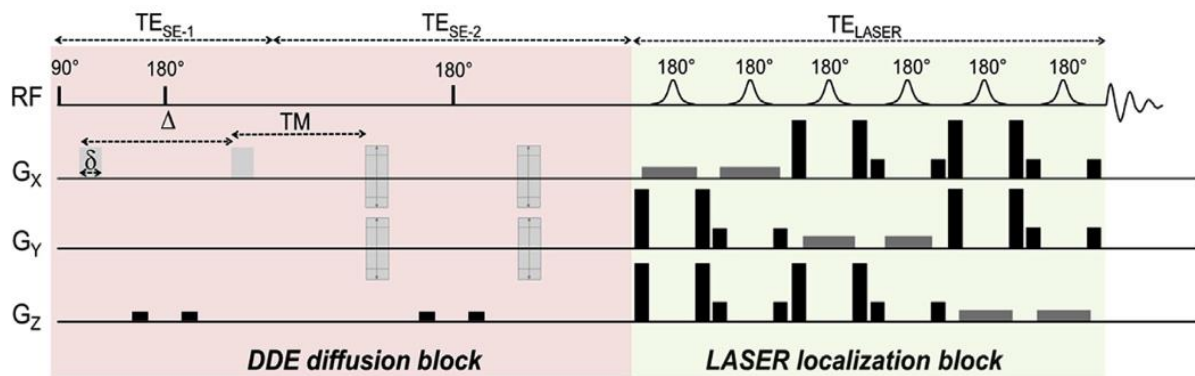
Le profil de cette nouvelle impulsion est présenté figure 5-8. Sa bande passante de 1800 Hz lui confère une excellente stabilité, et, comme on peut le constater sur le spectre (figure 5-8-C), le pic de *myo*-inositol n'est pas déformé, et il n'y a aucun effet de couplage J au niveau du lactate, rendant cette impulsion optimale pour l'étude de la diffusion du lactate *in vivo*.



**figure 5-8** : A. Performance de l'impulsion "long single band" évaluée par des simulations de Bloch en fonction du déplacement chimique  $\delta$  et de  $B_1$ . B. Profil fréquentiel pour un  $B_1$  optimal de 46,026  $\mu\text{T}$  et C. Spectre de métabolites obtenu avec la séquence SE-LASER Isb. Les résonances refocalisées par l'impulsion sont encadrées.

## 5.2. Double encodage en diffusion

Comme mentionné chapitre 3.6, la DDE permet de différencier les compartiments isotropes de ceux anisotropes (Mitra, 1995), est sensible à la distance entre embranchements le long des fibres cellulaires (Vincent et al., 2020), et permet donc d'apporter des informations complémentaires aux mesures de diffusion à hautes valeurs de  $b$ .

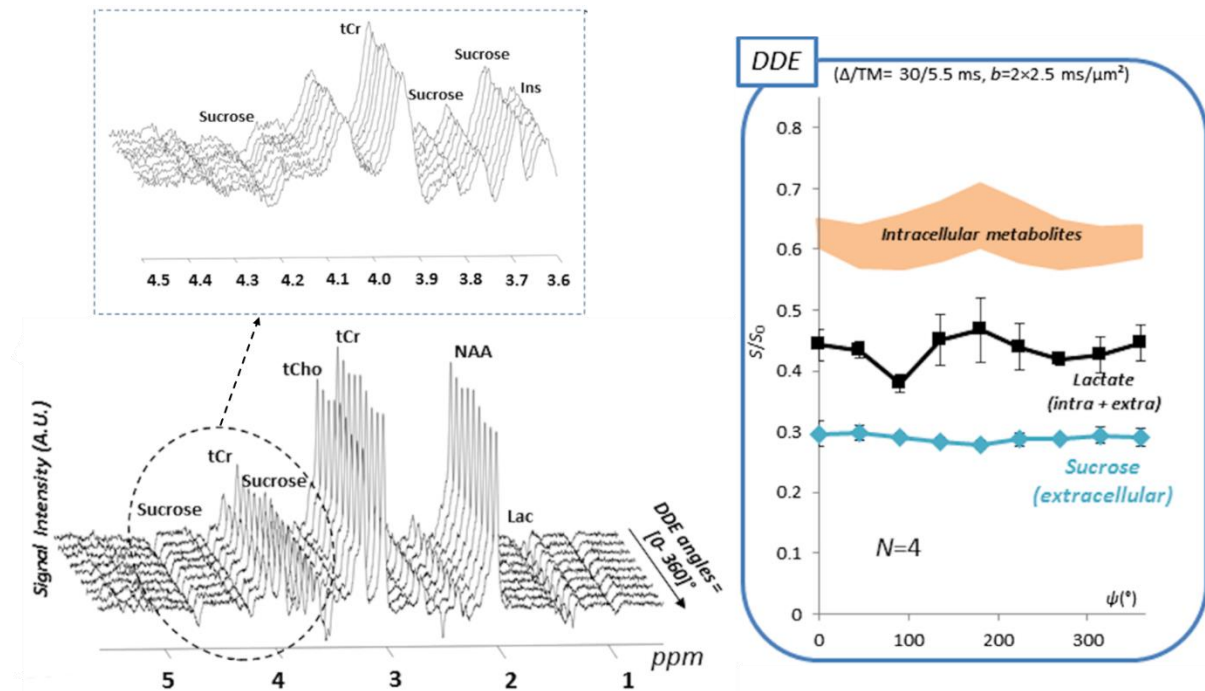


**figure 5-9** : Chronogramme de la séquence DDE-LASER. A gauche en rouge le bloc de diffusion d'écho de spin (SE), et à droite en rouge le bloc de localisation LASER. Les gradients de diffusion sont en gris clair, les gradients de localisation en gris foncé, et les gradients de crusher en noir. Extrait de Vincent et al., 2020

Des études utilisant la séquence DDE-LASER pour sonder la microstructure cellulaire (Vincent et al., 2020) et le milieu extracellulaire (Vincent et al., 2021) ont déjà été menées au sein du laboratoire. La séquence utilisée est décrite figure 5-9. Tout comme les séquences présentées précédemment, elle est constituée d'un bloc de localisation LASER précédé d'un double bloc de diffusion. Les impulsions à  $180^\circ$  utilisées ici sont des impulsions RF adiabatiques, puisque l'utilisation d'une paire d'impulsions adiabatiques pour la refocalisation entraîne un gain de signal important comparé à l'utilisation d'impulsions sélectives, sensibles au  $B_1$ .

Pour chaque acquisition, le premier bloc de diffusion est appliqué le long d'une direction X, et la direction d'application des gradients du second groupe varie selon un angle  $\varphi$  allant de 0 à 180 (ou 360°) dans un plan XY par rapport à X. Les mesures sont effectuées pour deux valeurs de  $b$  différentes : chaque bloc se voit appliquer une valeur

de pondération en diffusion égale à  $0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ou à  $5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  (pour une pondération totale de  $0,04 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ou  $10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  respectivement). L'atténuation du signal est alors mesurée en fonction de  $\varphi$  et correspond à  $\frac{S(\varphi)_{b=10\text{ms}/\mu\text{m}^2}}{S_{0,b=0,04\text{ms}/\mu\text{m}^2}}$ .

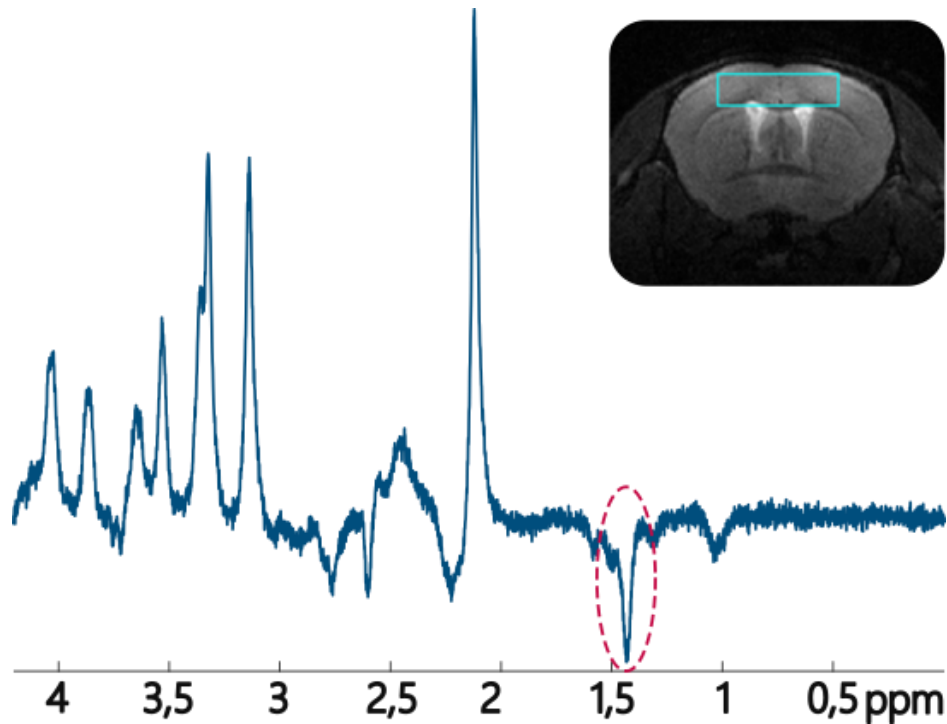


**figure 5-10** : dataset acquis avec la séquence DDE-LASER pour des angles allant de 0 à 360° pour  $b=10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , chez un animal dans l'hippocampe après injection de saccharose (sucrose) ; et atténuation du signal en fonction de l'angle pour les métabolites intracellulaires, le lactate, et le saccharose. Extrait de Vincent et al., 2021

Dans cette étude menée en 2021, les animaux ont reçu une injection de saccharose (sucrose en anglais) dans l'hippocampe, afin d'obtenir un marqueur de l'espace extracellulaire. L'atténuation du signal en fonction de  $\varphi$  a été tracée, et il a été constaté que le signal des métabolites était modulé en fonction de l'angle, alors que la signature DDE du saccharose restait relativement plate, étayant l'idée d'une diffusion extracellulaire isotrope à l'échelle du temps de mesure. L'atténuation du signal de lactate présentait quant à lui un comportement intermédiaire, cohérent avec une distribution intra et extracellulaire du métabolite (Vincent et al., 2021).

Dans ce travail de thèse, nous effectuons donc des mesures en DDE en complément des mesures à hautes valeurs de  $b$ . Nous reprenons la même séquence, dont les timings ( $TE_{SE}/TE_{LASER} = 119/25 \text{ ms}$ ,  $\Delta/\delta/TM = 30/4,5/29,5 \text{ ms}$ ) ont été choisis

de façon à inverser complètement le pic de lactate afin de minimiser la perte de signal liée à la J-modulation (figure 5-11). Pour maximiser le nombre d'acquisitions, et améliorer le SNR, nous avons également décidé de travailler sur une gamme d'angles allant de 0 à 180°.



**figure 5-11** : Exemple de spectre acquis dans le cortex d'une souris (voxel de 15  $\mu\text{L}$ ) avec la séquence DDE-LASER pour une pondération en diffusion considérée comme nulle ( $b = 0,04 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ). Le pic de lactate (cercle pointillé rouge) est complètement en antiphase.

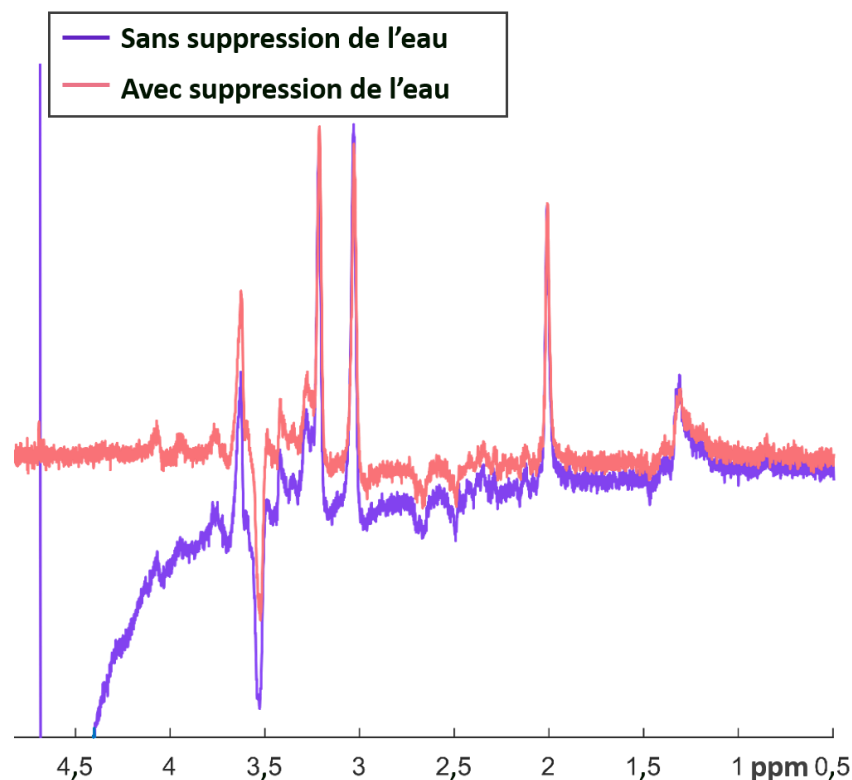
### 5.3. La suppression optimisée de l'eau avec le module VAPOR

La concentration de l'eau dans le cerveau étant presque 10 000 fois plus importante que celle des métabolites (Buonocore & Maddock, 2015), il est nécessaire pour pouvoir les détecter de s'affranchir du signal de l'eau lors de nos mesures. De plus, l'intensité du pic provoque des déformations au niveau de la ligne de base des spectres, rendant la quantification des métabolites proches difficile (figure 5-12).

Nous utilisons alors le module VAPOR, pour Variable Power radiofrequency pulses with Optimized Relaxation delays (Tkáč et al., 1999). Ce module est composé de

sept impulsions CHESS, pour chemical shift selective suppression (Haase et al., 1985). Un module CHESS est une séquence spécifique de trois impulsions RF sélectives, centrées sur le signal de l'eau à 4,7 ppm, encadrées par des gradients de déphasage qui n'agissent pas sur les métabolites mais qui dispersent l'aimantation dans le plan transversal. Dans le module VAPOR, les délais entre chaque impulsion CHESS ainsi que leurs angles de bascules sont optimisés pour avoir une suppression de l'eau maximale.

En règle générale, lorsque l'aimantation de l'eau n'est pas refocalisée, dans le cas de l'utilisation de l'impulsion polychromatique, la suppression de l'eau n'est pas nécessaire. Cependant, lorsqu'on utilise la séquence SE-LASER lsb, et malgré la présence d'une impulsion sélective, la figure 5-12 montre de façon très nette la nécessité de la suppression de l'eau. En effet, le profil fréquentiel de l'impulsion n'étant pas parfaitement lisse autour de la résonance de l'eau (figure 5-8-B), l'aimantation de l'eau est très légèrement refocalisée, mais suffisamment pour déformer le spectre acquis.



**figure 5-12** : exemple de spectres acquis expérimentalement avec la séquence SE-LASER LSB avec (rose) et sans (violet) pondération en diffusion. La ligne de base est très visiblement déformée sans suppression de l'eau.

## 6. MODELISATION ET MESURES DE REFERENCE

### 6.1. Modélisation de la microstructure

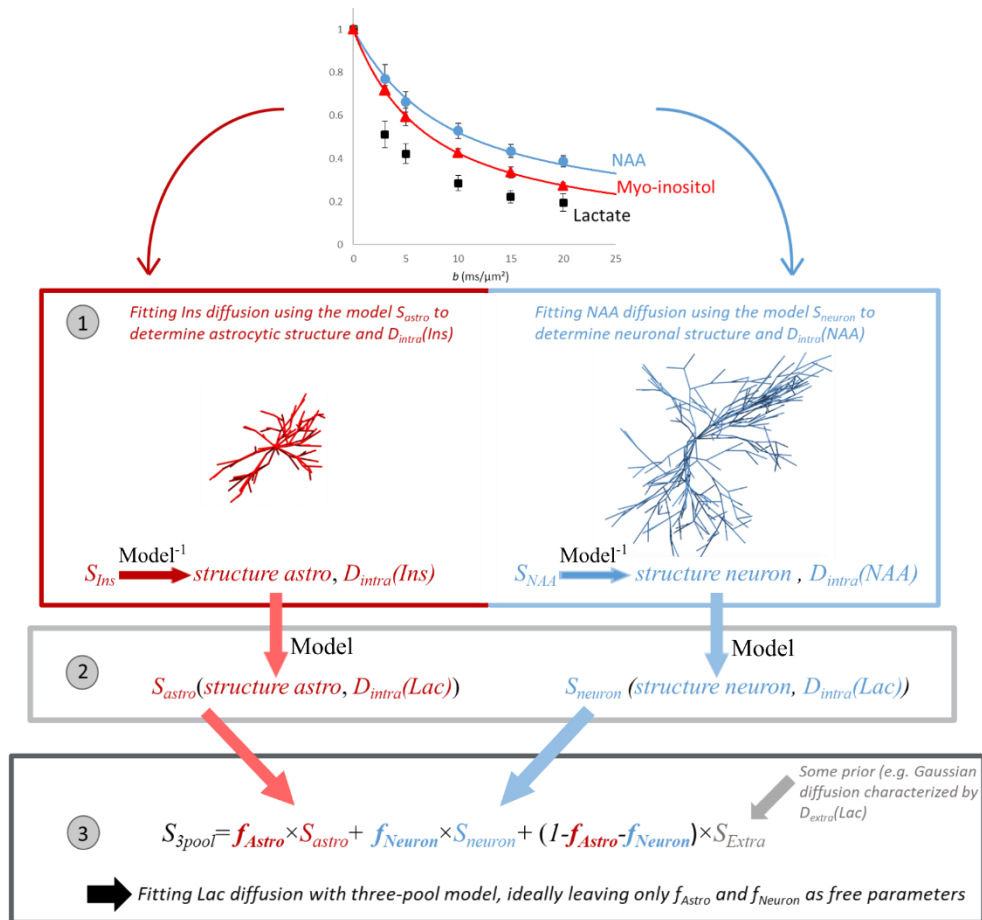
L'atténuation du signal des différents métabolites à elle seule n'est pas suffisante pour évaluer la compartimentation du lactate dans les neurones, astrocytes, et espace extracellulaire. Il est alors nécessaire de modéliser la diffusion des métabolites dans les différents compartiments qu'ils occupent afin d'espérer estimer la fraction de lactate dans chacun de ces compartiments.

Pour cela, nous utilisons des modèles représentant de manière relativement simple la cellule pour quantifier la fraction volumique de lactate dans chaque compartiment. L'idée générale est la suivante, et est décrite figure 6-1, en prenant pour exemple les signaux obtenus pour des mesures à hautes valeurs de  $b$  :

1. Les signaux pondérés en diffusion du myo-inositol astrocytaire et du NAA neuronal sont *fittés* à l'aide d'un modèle de microstructure cellulaire pour en extraire les paramètres microstructurels pertinents des astrocytes et des neurones (rayon des fibres/corps cellulaires pour les hautes valeurs de  $b$ ) ainsi que les diffusivités intracellulaires  $D_{intra}$ .
2. Le signal pondéré en diffusion du lactate dans les astrocytes  $S_{astro}$  et dans les neurones  $S_{neuron}$  est prédit en utilisant les modèles et paramètres microstructurels estimés préalablement lors de la première étape.  $D_{intra}$  est ajusté pour le lactate en prenant en compte que sa petite taille lui confère une diffusivité plus rapide.
3. Le signal pondéré en diffusion du lactate mesuré expérimentalement est ensuite *fitté* à l'aide d'un modèle à trois compartiments, en laissant libre la fraction de lactate dans chaque compartiment, avec  $S_{astro}$  et  $S_{neuron}$  déterminés lors de l'étape 2, et surtout en considérant que les échanges de lactate sont négligeables à l'échelle du temps de diffusion. Pour l'espace extracellulaire ( $S_{ECS}$ ), on considère, grâce aux précédents travaux de Mélissa Vincent sur les propriétés de diffusion dans l'espace extracellulaire (Vincent et al., 2021), que la diffusion suit une forme fonctionnelle équivalente à une diffusion libre (diffusion Gaussienne). On exprime alors le signal de lactate de la façon suivante :

$$S = f_{astro} \times S_{astro} + f_{neuron} \times S_{neuron} + (1 - f_{neuron} - f_{astro}) \times S_{ECS} \quad (VI. 1.1)$$

On obtient ainsi la fraction de lactate dans chaque compartiment, ainsi que des informations microstructurelles astrocytaires et neuronales, en fonction du modèle choisi. Dans ce travail de thèse, il s'agit d'un modèle de cylindres infinis représentant les fibres cellulaires (le corps cellulaire est considéré comme négligeable), ou d'un modèle de sphères et cylindres, qui correspond au modèle de cylindres infinis auquel on rajoute une contribution du corps cellulaire, représenté par des sphères.



**figure 6-1** : description des différentes étapes de modélisation conduisant à la détermination de la fraction de lactate dans chaque compartiment. 1 : les signaux du NAA et de l'Ins sont *fittés* en utilisant un modèle de microstructure. 2. Le signal du lactate dans les astrocytes et dans les neurones est prédit en utilisant le modèle et les paramètres microstructurels de 1. 3. Le signal du lactate est *fitté* en utilisant un modèle à trois compartiments et en laissant libre la fraction dans chaque compartiment. Pour  $S_{ECS}$ , on considère une diffusion Gaussienne.

### 6.1.1. Les modèles utilisés pour les mesures en hautes valeurs de $b$

#### Le modèle de cylindres infinis

Nous utilisons un modèle de cylindres infinis, orientés de façon aléatoire, pour décrire les fibres cellulaires (Linse & Soderman, 1995). Ce modèle est dit infini puisque l'on considère qu'à l'échelle des temps de diffusion que nous utilisons, le métabolite n'a pas le temps de diffuser suffisamment pour être limité par la longueur des fibres. Ce modèle a été initialement développé au sein du laboratoire par Marco Palombo en tant que post-doctorant (Palombo et al., 2017). On considère que le signal de diffusion dans les fibres peut s'approximer en la somme des signaux provenant des cylindres orientés aléatoirement. Chaque fibre est orientée d'un angle  $\theta$  par rapport au gradient de diffusion, ce qui conduit à deux régimes de diffusion différents : une diffusion restreinte dans le plan perpendiculaire à l'axe de la fibre, qui résulte en un gradient de force effective  $g \cdot \sin(\theta)$  (ou  $g_{\perp}$ ), et une diffusion libre dans le long de la fibre, ce qui résulte en un gradient de force effective  $g \cdot \cos(\theta)$ , ou  $g_{\parallel}$ .

Lorsque le gradient est orienté d'un angle  $\theta$  par rapport à l'axe de la fibre/cylindre de rayon  $r_f$ , l'atténuation du signal dans la fibre est donnée par les équations suivantes, pour  $\delta$  court (Linse & Soderman, 1995):

$$E_{\text{fiber}}(\theta, r_f, D_{\text{intra}}, g, \delta, t_d) = \left\{ \frac{[2J_1 \gamma g_{\perp} \delta r_f]^2}{(\gamma g_{\perp} \delta r_f)^2} + 8(\gamma g_{\perp} \delta r_f)^2 A_{nm} \right\} \exp(-D_{\text{intra}}(\gamma g_{\parallel} \delta)^2 t_d) \quad (\text{VI. 1.2. a})$$

avec

$$A_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ \frac{1}{1+\delta_{n0}} [J'_n \gamma g_{\perp} \delta r_f]^2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2)[\alpha_{nm}^2 - (\gamma g_{\perp} \delta r_f)^2]} \exp\left(-\frac{D_{\text{intra}} \alpha_{nm}^2 t_d}{r_f^2}\right) \right\} \quad (\text{VI. 1.2. b})$$

où  $J_n$  est la fonction de Bessel d'ordre  $n$ ,  $\alpha_{nm}$  est la  $m^{\text{ème}}$  racine positive de l'équation de Bessel  $J'_n=0$ ,  $\delta_{n0}$  est le symbole de Kronecker, et  $D_{\text{intra}}$  est la diffusivité libre le long de l'axe du cylindre.

Le signal dans les fibres peut donc s'écrire sous la forme :

$$S_{\text{fiber}}(r_f, D_{\text{intra}}, g, \delta, t_d) = \frac{\int_0^{\pi} d\theta \sin(\theta) E_{\text{fiber}}(\theta, r_f, D_{\text{intra}}, g, \delta, t_d)}{\int_0^{\pi} d\theta \sin(\theta)} \quad (\text{VI. 1.3})$$



On peut dès lors utiliser cette atténuation théorique pour *fitter* nos données en fonction de  $b = (\gamma\delta)^2 t_d$ , et en déduire une estimation des valeurs de rayon de fibres  $a$  et de diffusivité intracellulaire libre  $D_{intra}$ . Pour cela, nous utilisons une fonction de régression des moindres carrés non linéaires implantée sous Matlab : `fmincon`.

Une fois l'atténuation du signal des métabolites intracellulaires *fittée*, les rayons des fibres astrocytaires  $r_{f_{as}}$  et neuronales  $r_{f_n}$  ainsi que les diffusivités intra-astrocytaire et intra-neuronale  $D_{intra}(Ins)$  et  $D_{intra}(NAA)$  ont été estimés à partir des signaux du *myo*-inositol et NAA respectivement.

Les diffusivités astrocytaires et neuronales du lactate  $D_{as}$  et  $D_n$  (respectivement) peuvent alors être déduites à partir de  $D_{intra}(Ins)$  et  $D_{intra}(NAA)$  estimées :

$$D_{astro} = D_{free}(Lac) \times \frac{D_{intra}(Ins)}{D_{free}(Ins)} \quad (VI. 1.4. a)$$

$$D_{neuro} = D_{free}(Lac) \times \frac{D_{intra}(NAA)}{D_{free}(NAA)} \quad (VI. 1.4. b)$$

où  $D_{free}$  est le coefficient de diffusion libre mesuré dans des fantômes ( $D_{free}(Ins)=0,76 \mu m^2/ms$  ;  $D_{free}(NAA)=0,75 \mu m^2/ms$  ; et  $D_{free}(Lac)=0,99 \mu m^2/ms$ ).

Il est alors possible de *fitter* le signal du lactate et en déduire les fractions volumiques dans les différents compartiments selon l'équation suivante :

$$S = f_{as} \times S_{as}(r_{f_{as}}, D_{as}) + f_n \times S_n(r_{f_n}, D_n) + (1 - f_n - f_{as}) \times S_{ECS}(D_{extra}) \quad (VI. 1.5)$$

avec  $S_{as}$  la composante astrocytaire du signal et  $S_n$  la composante neuronale du signal du lactate. Comme évoqué plus haut, nous considérons que la diffusion dans l'espace extracellulaire s'apparente à une diffusion libre, soit  $S_{ECS} = \exp(-bD_{extra})$ . Les paramètres libres dans VI.1.5 sont  $f_{as}$ ,  $f_n$  et  $D_{extra}$ .

On en déduit les fractions astrocytaire  $f_{as}$ , neuronale,  $f_n$  et extracellulaire ( $1 - f_{as} - f_n$ ) de lactate.

Ce modèle reste néanmoins très simple puisqu'il ne prend pas en compte la composante des corps cellulaires, ou soma.

## Le modèle de sphères et de cylindres

Pour tenir compte du corps cellulaire, qui représente 15 à 20% du volume cellulaire total (Ligneul et al., 2019), nous pouvons ajouter au modèle de cylindres infinis un modèle de diffusion dans des sphères. On peut alors exprimer le signal  $S_{\text{soma}}$  dans les soma de rayon  $r_s$  tel que :

$$S_{\text{soma}}(r_s, D_{\text{intra}}, g, \delta, t_d) = \frac{[3]_1 \gamma g \delta r_s]^2}{(\gamma g \delta r_s)^2} + 6(\gamma g \delta r_s)^2 B_{nm} \quad (\text{VI. 1.6. a})$$

avec

$$B_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ [j'_n \gamma g \delta r_s]^2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{(2n+1) \alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2 - n)[\alpha_{nm}^2 - (\gamma g \delta r_s)^2]^2} \exp\left(-\frac{D_{\text{intra}} \alpha_{nm}^2 t_d}{r_s^2}\right) \right\} \quad (\text{VI. 1.6. b})$$

où  $j_n$  est la fonction de Bessel sphérique du premier ordre et  $\alpha_{nm}$  est la  $m^{\text{ème}}$  racine positive de l'équation de Bessel  $j'_n=0$  (Linse & Soderman, 1995).

En fixant le ratio de 20% soma/80% fibres, on peut alors utiliser cette formule pour en déduire le signal total d'atténuation dans la cellule en fonction de  $b$  :

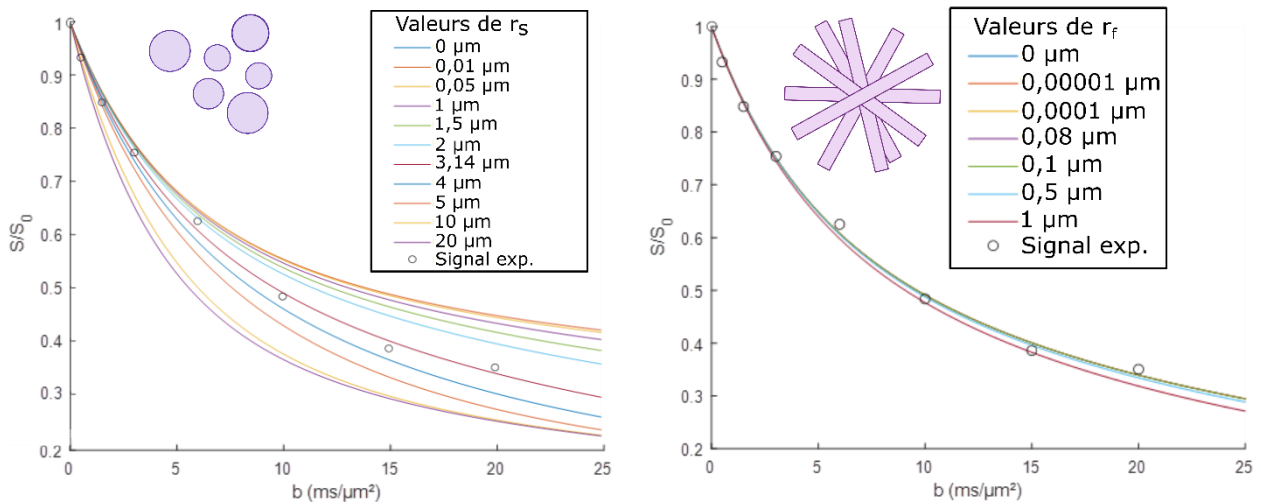
$$S(b) = 0,8 \times S_{\text{fiber}}(r_f, D_{\text{intra}}, b) + 0,2 \times S_{\text{soma}}(r_s, D_{\text{intra}}, b) \quad (\text{VI. 1.7})$$

De la même façon qu'en utilisant le modèle de cylindres infinis, le signal du lactate peut ensuite être *fitté* pour en déduire les fractions volumiques selon :

$$S = f_{\text{as}} \times S_{\text{as}}(r_{\text{fas}}, r_{\text{sas}}, D_{\text{as}}) + f_n \times S_n(r_{\text{fn}}, r_{\text{sn}}, D_n) + (1 - f_n - f_{\text{as}}) \times S_{\text{ECS}}(D_{\text{extra}}) \quad (\text{VI. 1.8})$$

avec  $r_{\text{sas}}$  et  $r_{\text{sn}}$  les rayons des soma astrocytaires et neuronaux respectivement.

Il est intéressant de noter qu'en utilisant ce modèle, sur la gamme de valeurs de  $b$  que nous utilisons pour nos mesures, le rayon des fibres (dans des valeurs raisonnables) a très peu d'influence sur l'allure des *fits*, contrairement aux rayons des soma, comme illustré par la figure 6-2, ce qui est justifié par le fait que le signal de diffusion serait moins sensible aux fibres de plus petit diamètre (Burcaw et al., 2015). Pour cette raison, lors de la modélisation des résultats présentés partie 3, nous avons fixé le rayon des cylindres à 0  $\mu\text{m}$ .



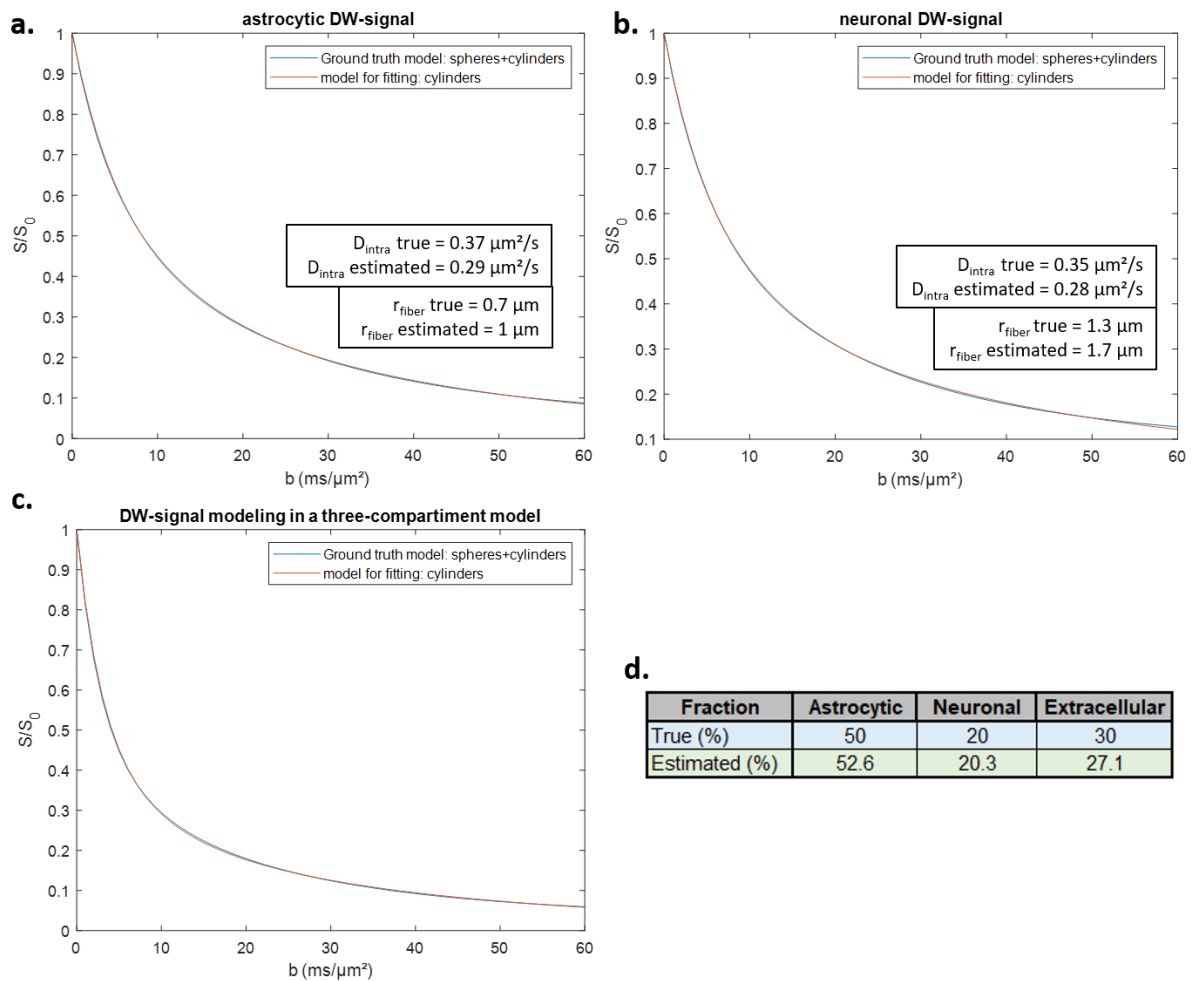
**figure 6-2** : allure des *fits* pour des valeurs de rayons de corps cellulaires (gauche) et fibres (droites) variables. Le signal expérimental *fitté* correspond à une moyenne des signaux de métabolites intracellulaires (cf chapitre 8)

### 6.1.2. Comparaison des deux modèles

Les modèles de microstructure des neurones et des astrocytes sont d'une importance capitale ici, et une question demeure : à quel point ces modèles doivent-ils être exacts ? Ou plus précisément, les modèles approximatifs produisant des paramètres microstructuraux biaisés sont-ils suffisants pour produire des fractions volumiques de lactate précises ? Pour répondre à ces questions, nous avons souhaité comparer les deux modèles présentés ci-dessus.

Nous avons d'abord simulé un signal pondéré en diffusion avec le modèle plus « réaliste » de sphères et cylindres, que nous avons ensuite *fitté* à l'aide du modèle plus simple constitué de cylindres uniquement (figure 6-3). Les signaux « synthétiques » du *myo*-inositol (figure 6-3-a) et du NAA (figure 6-3-b) ont été *fittés* avec le modèle de cylindres, conduisant à des rayons de fibres astrocytaires et neuronales effectifs et une diffusivité intracellulaire  $D_{\text{intra}}(\text{Ins})$  et  $D_{\text{intra}}(\text{NAA})$ . Les rayons des fibres estimés avec le modèle de cylindres sont plus importants que les rayons utilisés pour la simulation des signaux. Cette différence était attendue, puisque le rayon estimé des fibres est biaisé par la contribution du corps cellulaire.  $D_{\text{intra}}$  est également plus faible que la valeur

« réelle ». Les diffusivités astrocytaire  $D_{as}$  et neuronale  $D_n$  et du lactate ont ensuite été estimées à partir des équations (VI.1.4.a) et (VI.1.4.b) pour calculer le signal de diffusion du lactate dans les neurones ( $S_{neuron}$ ) et dans les astrocytes ( $S_{astro}$ ), pour finalement alimenter le modèle à trois compartiments et *fit* le signal de diffusion du lactate selon l'équation (VI.1.1). Pour la diffusion dans l'espace extracellulaire,  $D_{extra}$  est laissé comme paramètre libre. Au final, si l'on reprend l'équation (VI.1.2), seules les fractions de lactate astrocytaire et neuronal  $f_{as}$  et  $f_n$  et la diffusivité extracellulaire du lactate  $D_{extra}$  sont laissées libres.



**figure 6-3** : Atténuation du signal simulé en utilisant le modèle de sphères et cylindres et *fit* avec le modèle de cylindres uniquement, pour (a) une diffusion astrocytaire uniquement, (b) diffusion neuronale pure, et (c) diffusion dans un modèle de 3 compartiments (astrocytaire, neuronal, et espace extracellulaire). Les rayons des fibres neuronales et astrocytaires étaient imposés pour la simulation et estimés par le *fit*. La fraction de lactate dans chaque compartiment est donnée en (d).

L'atténuation du signal du lactate a été simulé à partir de fractions de lactate cohérentes avec la réalité : nous avons fixé  $f_{as} = 50\%$ ,  $f_n = 20\%$ , et  $f_{ECS} = 30\%$ . Le fit avec

le modèle de cylindres uniquement reste très proche du signal simulé (figure 6-3-c), et les fractions estimées ( $f_{as} = 53\%$ ,  $f_n = 20\%$ , et  $f_{ECS} = 27\%$ ) sont cohérentes avec les fractions nominales (figure 6-3-d).

Afin de s'assurer que les fractions sont estimées convenablement quelques soient les valeurs d'entrée, nous avons décidé de simuler différents signaux pondérés en diffusion du lactate pour une large gamme de fractions astrocytaire et neuronale. Les résultats, présentés par la figure 6-4, montrent que les fractions obtenues à partir du *fit* restent toujours raisonnablement précises.

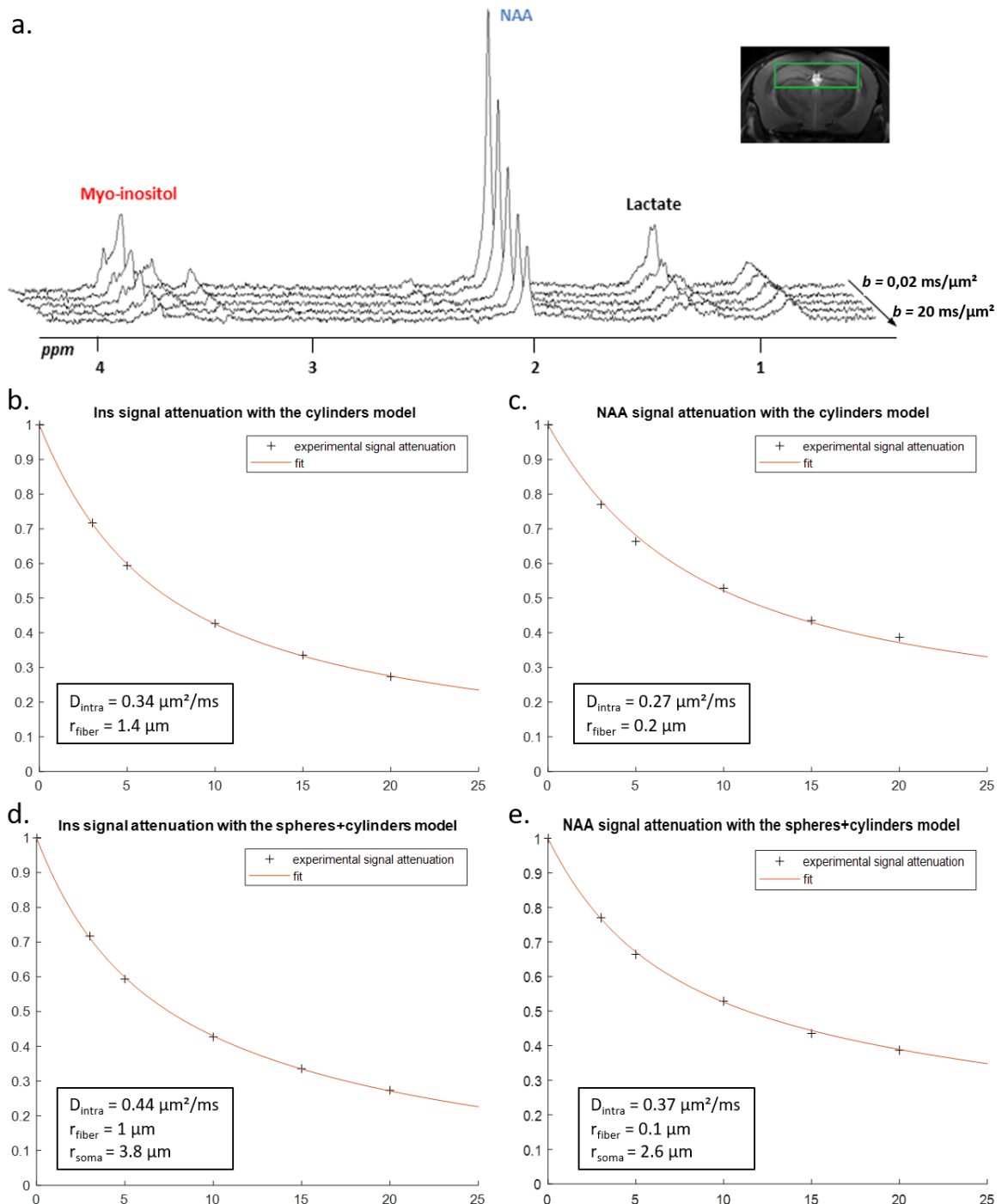
Fraction	Astrocytic	Neuronal	Extracellular
True (%)	1	90	9
Estimated (%)	4.5	94.9	0.6
True (%)	10	70	20
Estimated (%)	13	73.7	13.3
True (%)	20	50	30
Estimated (%)	22.6	52.4	25
True (%)	30	30	40
Estimated (%)	32.2	31.2	36.6
True (%)	50	20	30
Estimated (%)	52.6	20.3	27.1
True (%)	70	10	20
Estimated (%)	72.9	9.4	17.7
True (%)	90	1	9
Estimated (%)	92.7	0.2	7.1

**figure 6-4** : L'atténuation du signal pour différentes fractions astrocytaires et neuronales a été simulée en utilisant le modèle de sphères et cylindres, et fittée en utilisant le modèle de cylindres uniquement.

Nous avons ensuite souhaité comparer ces deux modèles sur les données *in vivo* acquises durant mon stage de master 2 et introduites chapitre 5. Les mesures avaient été faites sur 4 souris WT dans un voxel hippocampal de  $7 \times 1,5 \times 3 \text{ mm}^3$ , avec la séquence SE-LASER polychromatique ( $TE_{SE}/\delta/\Delta = 58,3/3/53,2 \text{ ms}$ ), pour six différentes valeurs de  $b$  telles que  $b = 0,02 ; 3,02 ; 5 ; 10 ; 15$  et  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ .

Ces données ont été analysées avec le modèle de cylindres uniquement de la même façon que pour les signaux simulés ; mais également avec le modèle de sphères et cylindres à titre de comparaison. Dans ce dernier cas, nous avons considéré que le

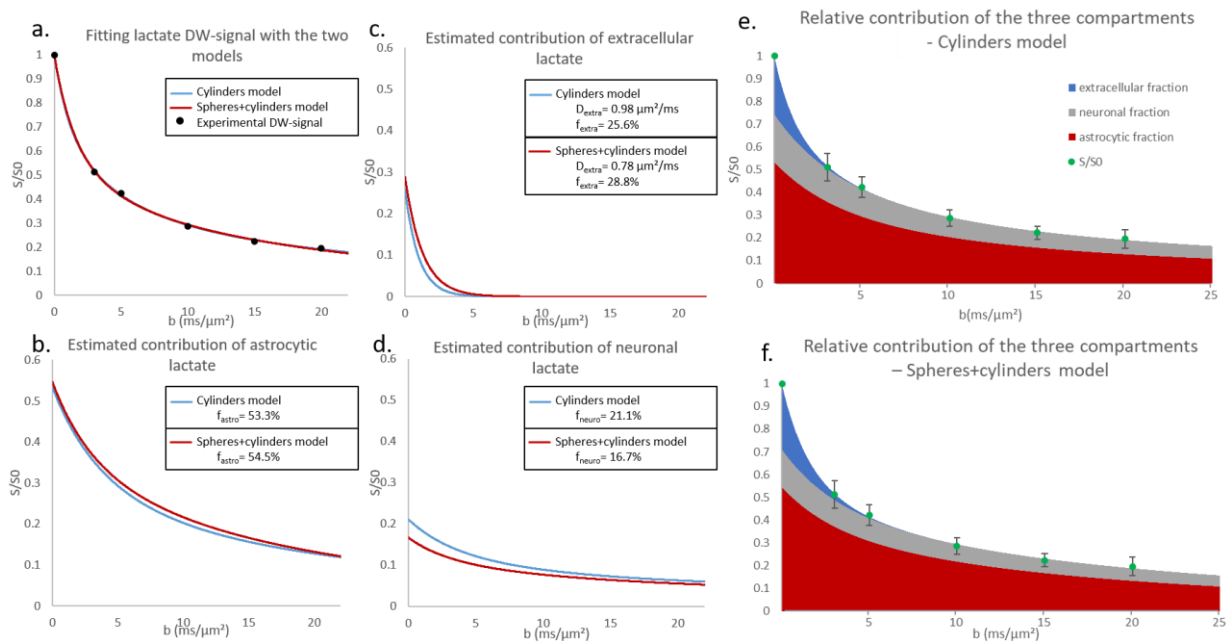
rapport du volume des corps cellulaires par rapport aux fibres était de 20%/80%, et nous avons laissé les rayons des corps cellulaire et fibres et la diffusivité intracellulaire comme paramètres libres lors du *fit* de l'inositol et du NAA.



**figure 6-5 :** Les deux modèles de simulations ont été utilisés sur les données in vivo (a). Les signaux de l'Ins et du NAA ont été *fités* avec le modèle de cylindres (b. et c. respectivement) et avec le modèle de sphères et cylindres (d. et e. respectivement).

Les résultats pour ces deux métabolites intracellulaires sont visibles sur la figure 6-5. Similairement aux résultats sur données simulées, on retrouve, avec le modèle de cylindres uniquement, un rayon des fibres surestimé par rapport aux valeurs données par le modèle de sphères et cylindres, et une diffusivité intracellulaire plus faible. Les valeurs obtenues avec les deux modèles restent néanmoins cohérentes avec les valeurs réelles attendues.

Le signal du lactate a ensuite été *fitté* à partir de ces dernières valeurs figure 6-6. Les fractions estimées sont assez proches pour les deux modèles, et indiquent que le lactate est présent majoritairement dans les astrocytes.



**figure 6-6** : (a.) Fit du signal pondéré en diffusion du lactate par les deux modèles. Les contributions individuelles des compartiments (b.) astrocytaire, (c.) extracellulaire et (d.) neuronal sont comparées pour les deux modèles. Les fractions de lactate sont données pour chaque compartiment en fonction du modèle utilisé.  $D_{\text{extra}}$  estimée avec chaque modèle est également montrée (c.). La contribution des trois compartiments est montrée pour le modèle de (e.) cylindres et (f.) sphères et cylindres.

Ce travail montre donc que même des modèles simplistes et qui fournissent des valeurs de paramètres microstructuraux biaisées peuvent néanmoins être utilisés pour estimer les fractions de lactate avec une précision relativement correcte.

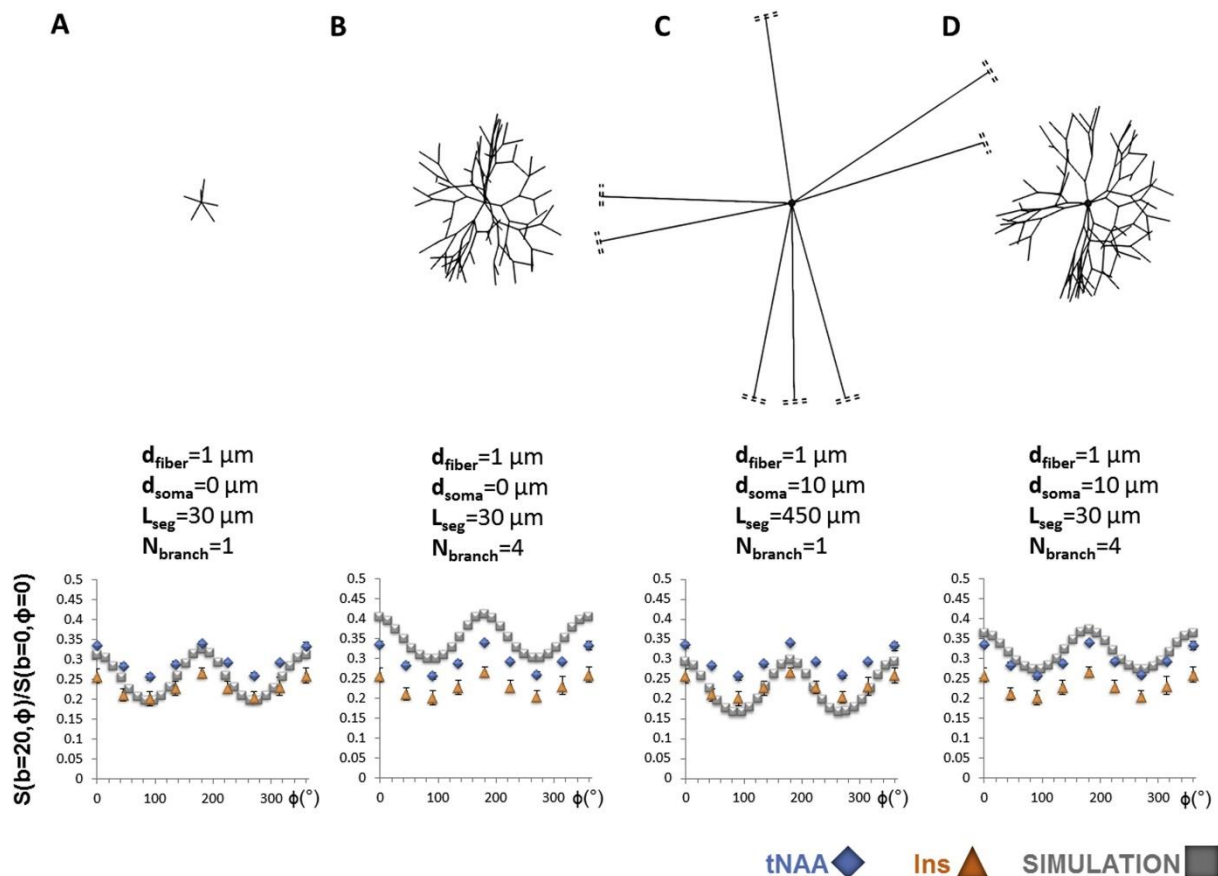
### 6.1.3. Et pour la DDE ?

Usuellement et de façon extrêmement simpliste, les données expérimentales acquises en DDE sont *fittées* par la fonction  $A+B \cos (2\Phi)$ . Le rapport  $B/A$  est extrait pour quantifier l'amplitude de la modulation angulaire par rapport à l'atténuation globale du signal. Simplement, plus le compartiment est étroit, ou plus la microanistropie est importante, et plus l'amplitude de la modulation sera grande (Shemesh et al., 2017). On peut également trouver dans la littérature des *fits* à l'aide de simulations dans un modèle de cylindres infinis. Cependant, il a été montré que ce modèle ne satisfait pas au *fit* des données DDE (Ilanuş et al., 2018) puisque les valeurs de diamètres sont bien trop surestimées. La DDE serait en effet plus sensible au nombre d'embranchements qu'à la longueur et au diamètre des fibres, comme illustré par la figure 6-7 (Vincent et al., 2020).

Dans notre cas, nous nous contenterons d'abord du *fit* à la fonction  $A+B \cos (2\Phi)$ . Même si cette modélisation est peu élaborée, elle pourrait néanmoins être suffisante pour éclairer sur la compartimentation du lactate et ses différences par rapport aux métabolites intracellulaires, mais également sur d'éventuels changements dans cette compartimentation. Cependant, cette modélisation étant purement phénoménologique et n'étant pas directement reliée à la microstructure, il est impossible de prédire le signal du lactate dans les compartiments purement astrocytaires et neuronaux, et donc d'utiliser la démarche générale décrite au début de ce chapitre.

Dans ce travail de thèse, il serait judicieux de coupler la modélisation des mesures à hautes valeurs de  $b$  à celle des mesures en DDE, en utilisant un modèle bien plus robuste, représentant au mieux les cellules, avec corps cellulaires fibres, et embranchements.





**figure 6-7** : 4 résultats de simulations superposés aux résultats obtenus en DDE pour l'Inositol (Ins) et le NAA, pour différents modèles cellulaires : A. Pour un modèle de fibres très courtes et connectées, B. pour un modèle de fibres courtes et connectées présentant des segments courts et 4 embranchements, C. Pour un modèle de fibres très longues connectées à un corps cellulaire représentant 16% du volume de la cellule, et D. Pour un modèle de fibres présentant des segments courts, 4 embranchements, et connectées au même corps cellulaire que le modèle précédent. Le modèle le plus adéquat est le dernier. Tiré de Vincent et al., 2020.

## 6.2. Les mesures électro-optiques et chimiques de référence

Afin de conforter les résultats obtenus via la modélisation, il est indispensable d'effectuer des mesures *in vivo* très précises de la concentration de lactate dans chacun des trois compartiments (astrocytes, neurones, et espace extracellulaire), très invasives, qui feront néanmoins office de « juge de paix ». Les mesures détaillées ci-dessous ont été développées et effectuées au sein du laboratoire par Rodrigo Lerchundi, post doctorant dans l'équipe.

### 6.2.1. Pour sonder le milieu extracellulaire : les microélectrodes

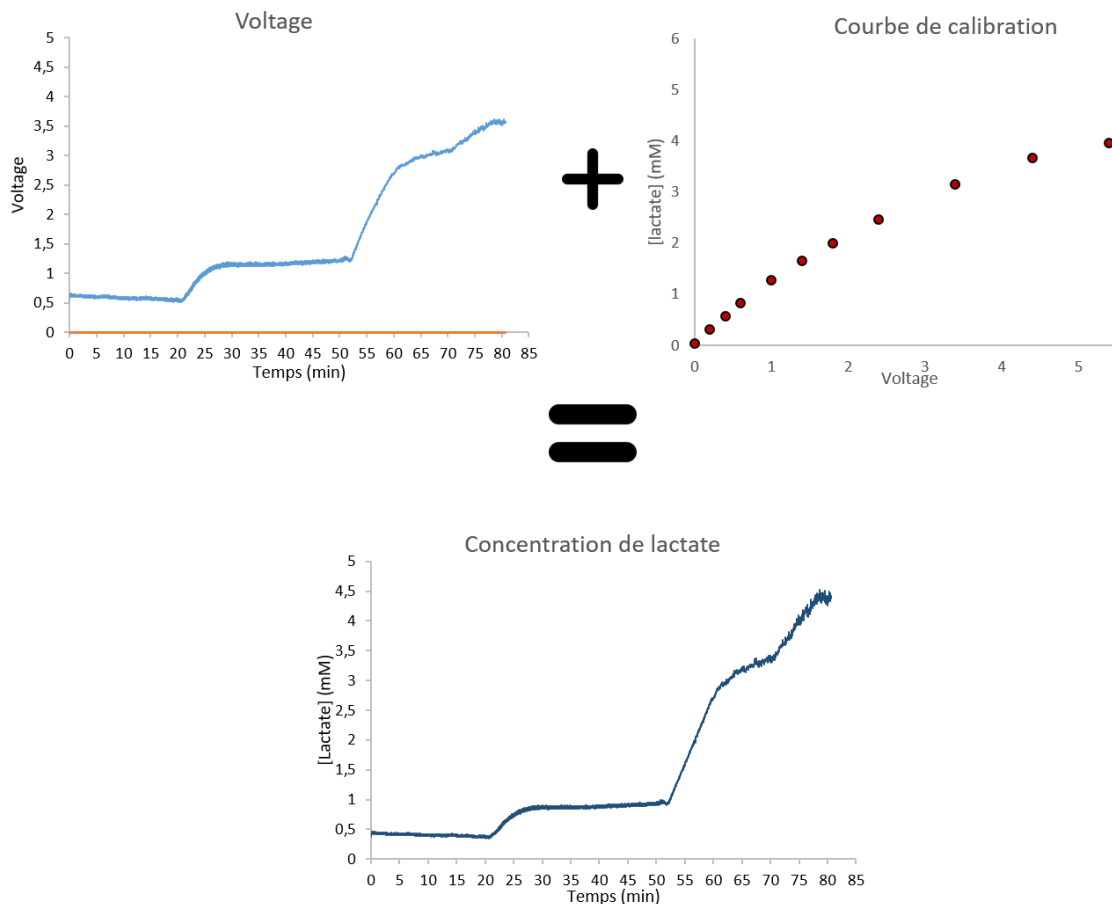
Une méthode pour mesurer la concentration de lactate est l'utilisation de biosenseurs enzymatiques qui peuvent être implantés directement dans le cerveau. On utilise alors des microélectrodes enzymatiques (Balança et al., 2017; Chatard et al., 2018; Karagiannis et al., 2016; Viggiano et al., 2012). Le principe de telles électrodes implique la présence d'une enzyme spécifique à proximité de la surface de l'électrode. L'enzyme en question doit catalyser une réaction liée au métabolite qui nous intéresse, qui implique la consommation d'un réactif électro-actif ou la génération d'une espèce électro-active. Cette catalyse est détectée par l'électrode, ce qui à terme nous conduit à une mesure directe de la concentration du métabolite d'intérêt. Pour la mesure de la concentration de lactate, deux enzymes sont principalement utilisées : la lactate déshydrogénase, ou la lactate oxydase (LOD) (Rathee et al., 2016).

Dans notre cas, nous utilisons la lactate oxydase, qui catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate en présence d'oxygène, et forme du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde est électro chimiquement actif et peut être réduit ou oxydé pour créer un courant d'amplitude proportionnelle à la concentration de lactate (Meyerhoff et al., 1993; Pfeiffer et al., 1997). En calibrant l'électrode *in vitro*, il est possible de déterminer la concentration absolue de lactate dans l'espace extracellulaire. La calibration se fait en augmentant progressivement les concentrations de lactate dans du PBS à 37°C, et est réalisée avant et après chaque expérience. Ce biosenseur est très sélectif : comme il a pu être mesuré *in vitro* au laboratoire, il ne réagit pas à la molécule dont la conformation est la plus proche du lactate, le pyruvate.

Les mesures *in vivo* se font sur souris anesthésiées à l'isoflurane par implantation dans le cortex de façon symétrique d'une électrode contrôle au BSA et une électrode recouverte du biosenseur sensible au lactate. Pour minimiser la douleur, deux injections en sous-cutané sont réalisées 30 minutes avant l'implantation : une de xylocaïne au niveau du crâne et une de buprénorphine. Après implantation, le protocole d'anesthésie est le suivant :

1. Les premières mesures sont faites sous perfusion lente de médétomidine (0,06 mg/kg/h) afin d'établir une ligne de base, pendant une vingtaine de minutes.
2. La perfusion lente est arrêtée et l'animal est anesthésié à 1% d'isoflurane, pour correspondre aux conditions d'anesthésie à l'IRM pendant 1 heure.
3. La concentration d'isoflurane est progressivement augmentée à 2 puis 4% pour contrôler la (non) saturation des senseurs.

A titre d'exemple, les courbes issues d'une expérience réalisée selon ce protocole sont données figure 6-8.



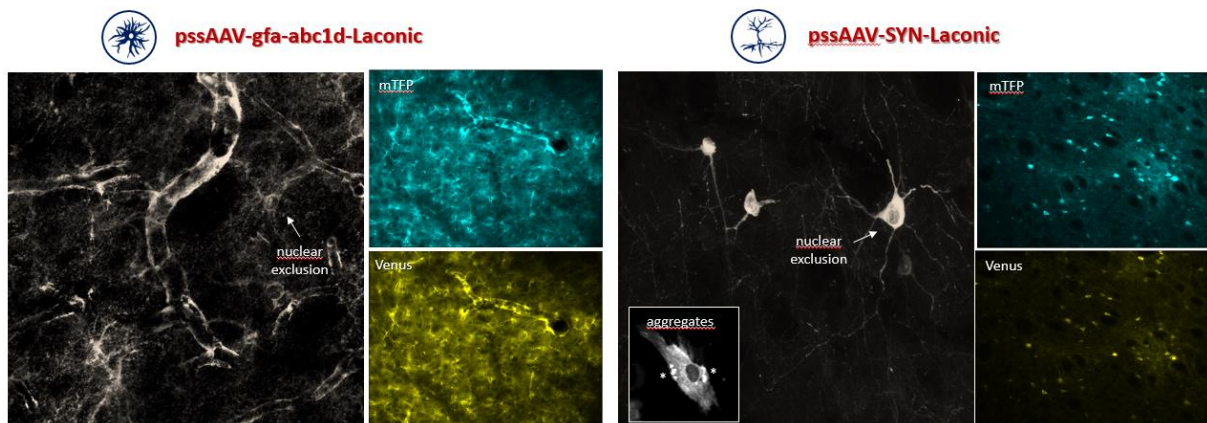
**figure 6-8 :** illustration des résultats d'une expérience de mesure de concentration de lactate selon le protocole décrit. On mesure directement le voltage au niveau des micro-électrodes, et, grâce à la courbe de calibration, il est possible d'extraire une concentration de lactate extracellulaire.

### 6.2.2. Pour sonder le milieu intracellulaire : l'implantation de fibre optique

Il n'est pas possible de mesurer la concentration de lactate intracellulaire à partir des microélectrodes décrites ci-dessus. Il est néanmoins possible d'exprimer, après transfert de gènes, des protéines fluorescentes sensibles au lactate, et ceci spécifiquement dans les neurones ou les astrocytes grâce à l'utilisation de différents promoteurs (Lambers et al., 2022; San Martín et al., 2013). Nous pouvons ensuite faire de l'imagerie de fluorescence dans cette partie du cerveau, en suivant le même protocole que pour les microélectrodes.

L'idée générale repose sur la détection de lactate intra-neuronal ou intra-astrocytaire par mesure de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (Förster Resonance Energy Transfer, ou FRET). Pour cela, on injecte par voie rétro-orbitale d'un virus adéno-associé (ou AAV) porteurs des promoteurs GFAP (pour les astrocytes) ou synapsine (pour les neurones), afin d'induire l'expression du senseur de lactate pour le FRET.

Une fibre optique est implantée dans la région corticale du cerveau de souris par stéréotaxie. Chaque animal implanté reçoit également un AAV qui induit l'expression du senseur soit dans les neurones (AAV2/9-SYN-Laconic), soit dans les astrocytes (AAV2/9-gfa-abc1d-Laconic). En envoyant une lumière à 430 nm à travers la fibre, on excite la protéine mTFP, et on collecte ensuite l'émission de deux fluorophores de façon simultanée : le mTFP (donneur) et Venus (accepteur). On mesure ainsi le ratio mTFP/Venus. Lorsque la concentration de lactate augmente dans le milieu, la fluorescence de Venus diminue tandis que celle de mTFP augmente. Le ratio mTFP/Venus est donc plus important dans ce cas.



**figure 6-9** : illustration d'imagerie FRET de coupes de cerveau de souris. On remarque que le senseur est principalement présent dans le cytosol et démontre une exclusion nucléaire.

Des mesures ont été réalisées *ex vivo* sur des coupes de cerveaux exprimant le senseur (figure 6-9). En perfusant les coupes pendant 20 minutes avec du liquide cérébro-spinal artificiel contenant 20 mM de lactate, il a été détecté des modifications réversibles dans le ratio FRET. Cette méthode a permis de déterminer la gamme dynamique du senseur via photométrie. Cependant, la perfusion induit un mouvement des cellules, empêchant la réalisation des courbes de calibrations nécessaires pour déterminer, à terme, la concentration absolue de lactate neuronal et astrocytaire. Ces mesures *ex vivo* ont également permis de montrer une émission de fluorescence fiable

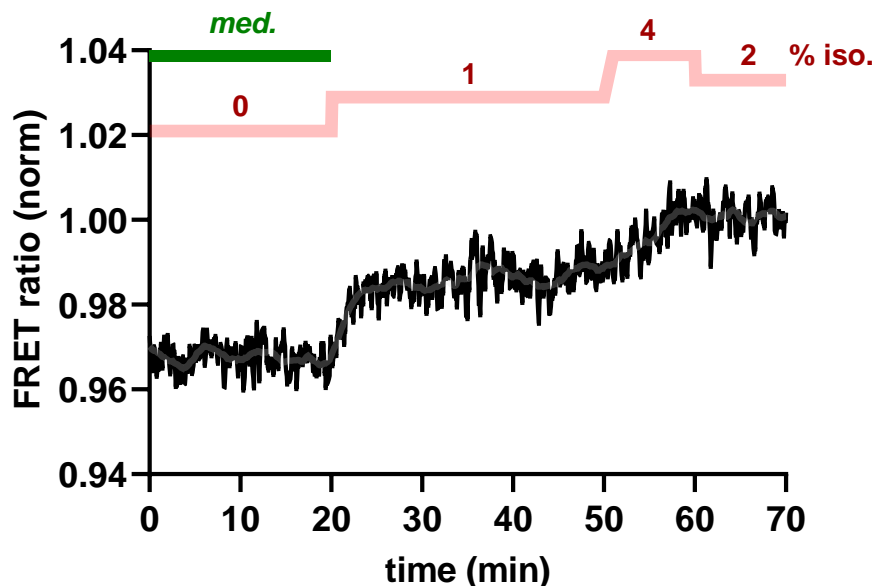
des deux protéines fluorescentes, ce qui suggère une maturation suffisante du senseur au sein des cellules.

Pour chaque expérience, le protocole d'anesthésie est similaire aux mesures de lactate extracellulaire :

1. Les premières mesures sont faites sous perfusion lente de médétomidine (0,06 mg/kg/h) afin d'établir une ligne de base, pendant une vingtaine de minutes.
2. La perfusion lente est arrêtée et l'animal est anesthésié à 1% d'isoflurane, pour correspondre aux conditions d'anesthésie à l'IRM pendant 1 heure.
3. La concentration d'isoflurane est progressivement augmentée à 2 puis 4% pour saturer les senseurs.

Avant chaque expérience, le câble qui sera relié à la fibre optique implantée a été blanchi pendant au moins 24 heures par illumination continue à 430 nm. Pour éviter le blanchiment et la phototoxicité au niveau du senseur, l'illumination est discontinuée.

A titre d'exemple, le résultat d'une mesure FRET réalisée pour une souris est illustré par la figure 6-10.



**figure 6-10** : résultats d'une expérience FRET selon le protocole décrit, dans les astrocytes

## Publications associées

SFRMBM 2021 : Communication orale

Malaquin, S., Mougel, E., Vincent, M., & Valette, J. **Séquence RMN in vivo supprimant la J-modulation pour mesurer la diffusion du lactate dans le cerveau de rongeurs.** SFRMBM 2021

ISMRM 2021 : Poster électronique

Malaquin, S., Mougel, E., Vincent, M., & Valette, J. **Evaluation of a spectroscopy sequence using polychromatic refocusing to suppress J-modulation and measure lactate diffusion in the rodent brain.** Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 2021, 29, 2199.

ISMRM 2022 : Poster électronique

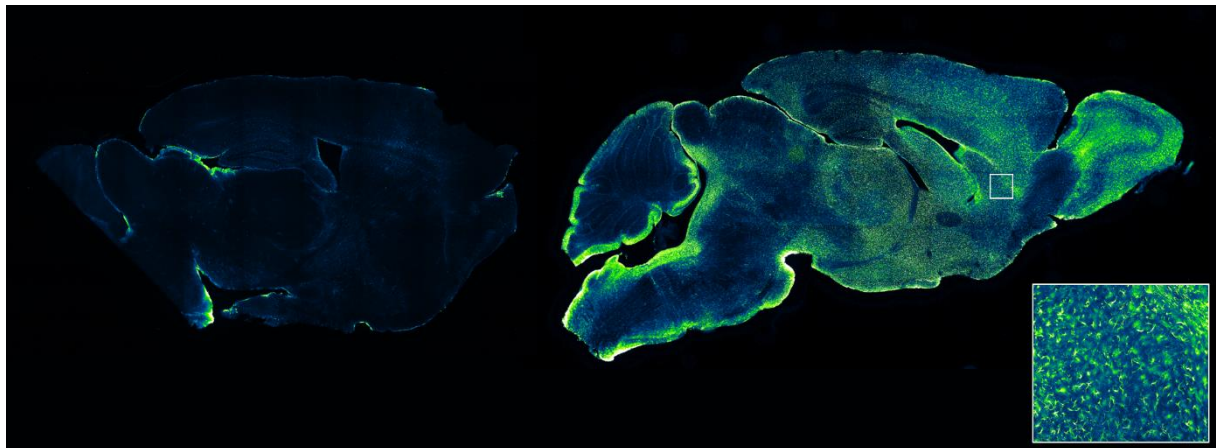
Malaquin, S. & Valette, J. **How modeling lactate diffusion may inform on its cellular compartmentation? An initial study.** Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 2022, 30, 1508.

### **7. MODELE D'ACTIVATION ASTROCYTAIRE**

#### **7.1. Le gène CNTF responsable de l'activation astrocytaire**

Le facteur neurotrophique ciliaire (ciliary neurotrophic factor, CNTF) est une cytokinine connue principalement pour ses rôles de neuroprotection (de Almeida et al., 2001), de régénération neuronale (P. D. Smith et al., 2009), ou encore pour ses propriétés anti-inflammatoires (Meazza et al., 1997).

Au laboratoire, nous l'utilisons principalement comme modèle d'activation astrocytaire : la présence de CNTF dans le milieu cellulaire induit une hypertrophie des astrocytes et une surexpression de la GFAP (figure 7-1). Pour cela, il faut surexprimer le CNTF par transfert de gènes en injection lentivirale. Cette technique, déjà réalisée au laboratoire (Escartin et al., 2007a; Ligneul et al., 2019), garantit une activation astrocytaire locale (autour du site d'injection), et stable (jusqu'à 6 mois).

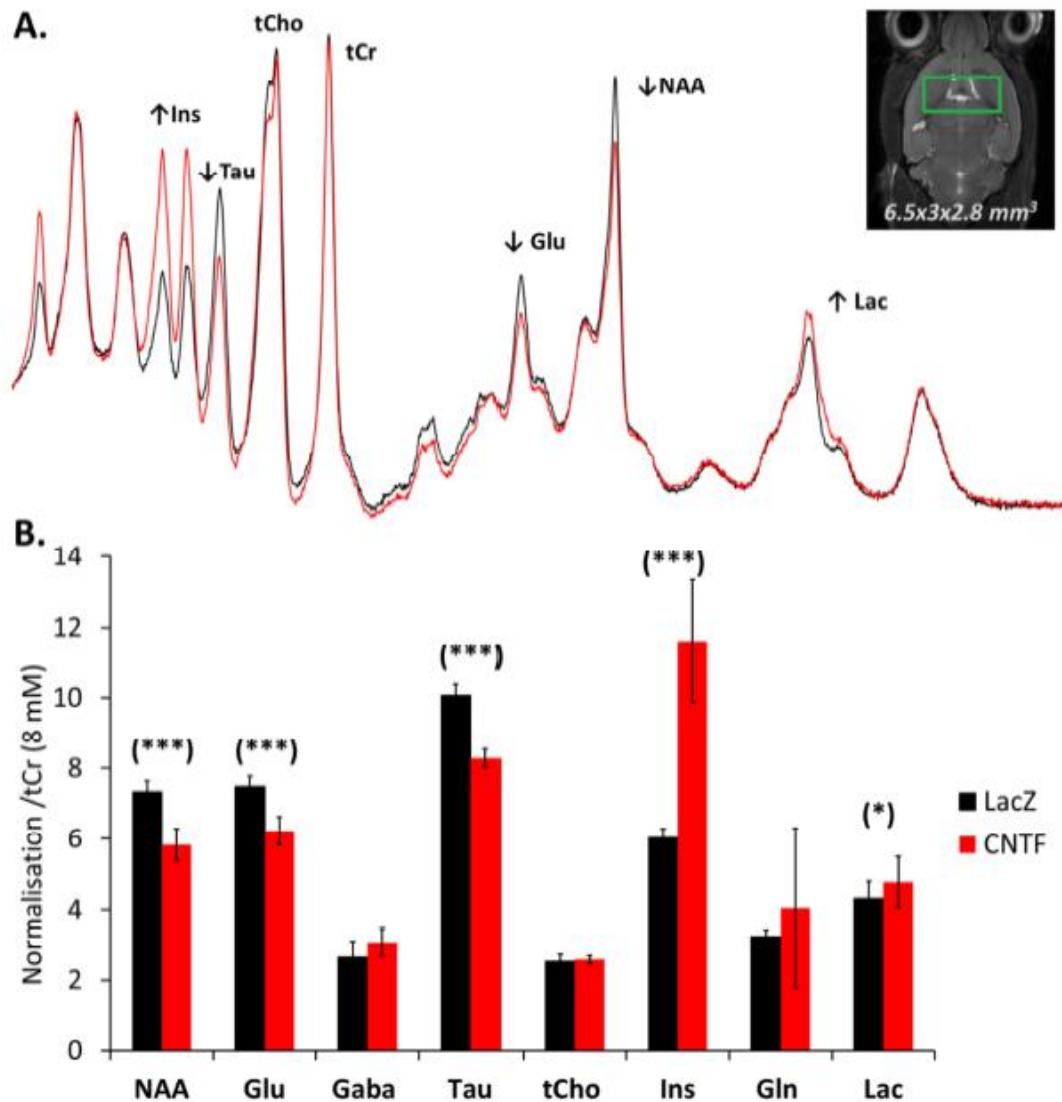


**figure 7-1** : immunohistochimie contre la GFAP sur des coupes de cerveau (45µm) de souris contrôle injectées au LACZ (gauche) et CNTF (droite). Les cellules positives au GFAP (en vert) sont entourées de plaques Aβ. Les images en bas correspondent au zoom de la région striatale marquée par un carré. Les coupes et images ont été effectuées par Rodrigo Lerchundi.

Afin d'étudier des groupes comparables, il est nécessaire que le groupe contrôle subisse une injection de lentivirus afin qu'il y ait transfection, mais tout en s'assurant

qu'il n'y a aucune conséquence spécifique sur le fonctionnement cérébral. Le gène LACZ semble être le candidat idéal : il exprime la  $\beta$ -galactosidase, l'enzyme hydrolysant le lactose, et qui ne semble avoir aucun effet au niveau cérébral (de Almeida et al., 2001).

Ce modèle avait déjà été caractérisé par spectroscopie pondérée en diffusion au laboratoire par (Ligneul et al., 2019).



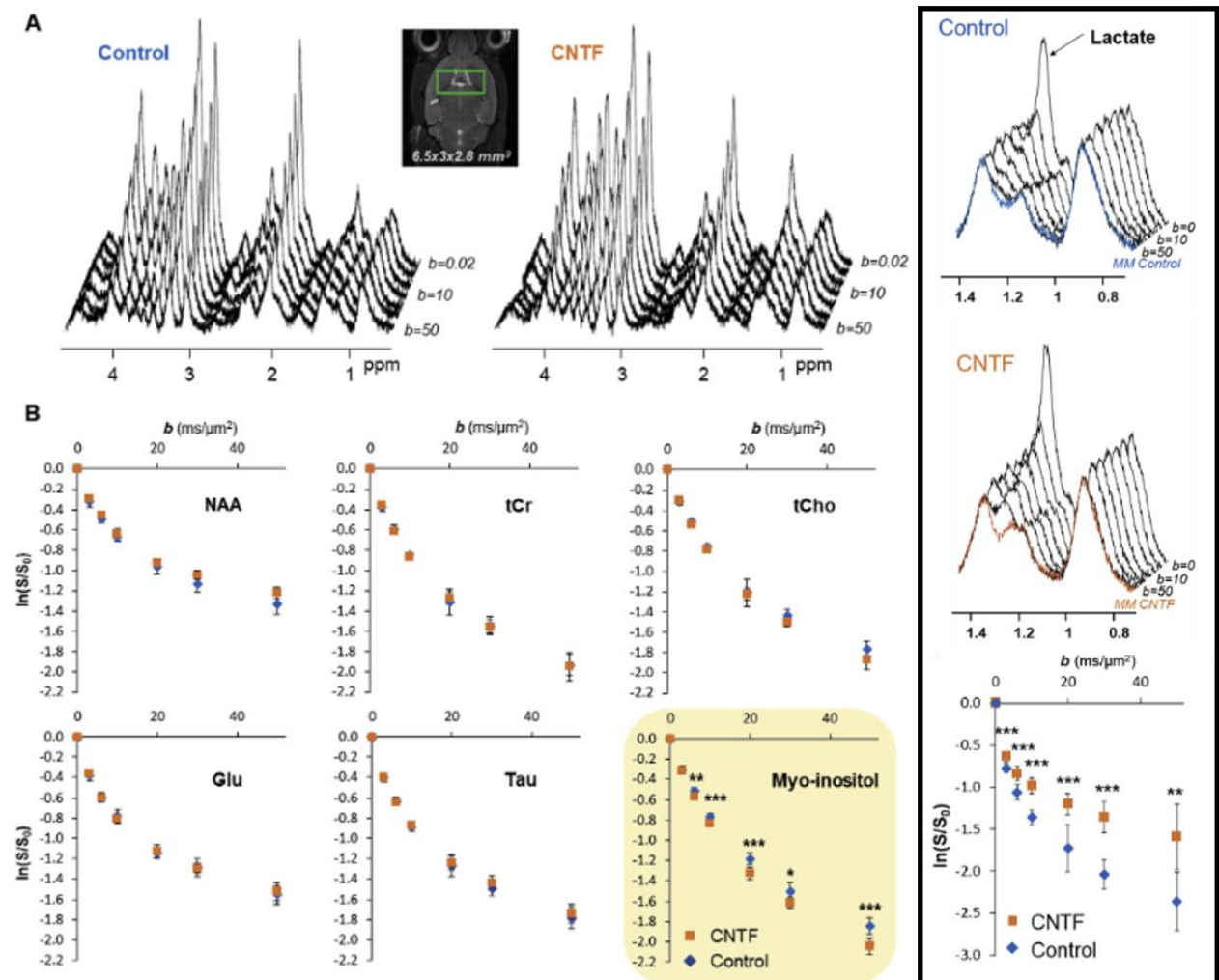
**figure 7-2** : Rappel des résultats obtenus par Clémence Ligneul. (A) Somme réalisée sur l'ensemble de 10 spectres acquis à  $b_0=0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la STELASER pour le groupe LacZ (noir) ou le groupe CNTF (rouge) (B) Concentrations normalisées par la tCr à 8mM, issues de l'analyse LCModel effectuée sur chaque spectre acquis à  $b_0$  pour les deux groupes. (Student t-test : (\*\*\*) p-value < 0,001, (\*) p-value < 0,05). Extrait de Ligneul, 2017.

Vingt souris WT mâles âgées de 3 mois avaient reçu une injection bilatérale de lentivirus CNTF (lenti-CNTF) ou LACZ (lenti-LACZ), pour former les groupes CNTF et



LACZ (contrôle) composés de dix animaux chacun. Six semaines après l'injection, les animaux avaient été scannés selon le même setup expérimental que celui décrit chapitre 4.

Les mesures pondérées en diffusion avaient été réalisées avec la séquence STE-LASER pour des valeurs de  $b$  allant de 0,02 à 50  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ , dans un grand voxel striatal de  $6,5 \times 3 \times 2,8 \text{ mm}^3$ , visible figure 7-2, et contenant 33 % de striatum. Les spectres de métabolites acquis à  $b_0 = 0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ainsi que les concentrations relatives (par rapport à la créatine totale) sont illustrés par la figure 7-2 (A et B) respectivement. Il a été significativement montré dans le groupe CNTF, une diminution de concentration des marqueurs neuronaux (tNAA, Glu) et une augmentation drastique de concentration du



**figure 7-3** : A. Spectres acquis avec la STE-LASER pour  $b = 0,02$  à  $50 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  du groupe contrôle et CNTF. B. Atténuation du signal de 6 métabolites intracellulaires en fonction de  $b$  pour chaque groupe. L'encart à droite illustre le comportement du lactate : le pic s'atténue beaucoup moins vite dans le groupe CNTF de façon significative. (Student t-test : (\*\*\*)  $p$ -value  $< 0,001$ , (\*)  $p$ -value  $< 0,05$ ). Extrait de Ligneul et al., 2019.

*myo*-inositol (métabolite astrocytaire) et de manière moins spectaculaire, du lactate.

Les mesures aux hautes valeurs de pondération en diffusion sont illustrées par la figure 7-3. L'atténuation du signal de l'inositol est significativement plus forte chez les souris CNTF. Cette information, couplée à la forte concentration de l'inositol, suggère une diffusion dans des compartiments aux fibres plus larges chez les CNTF que chez les LACZ, cohérent avec la réactivité astrocytaire. Des images acquises par microscopie confocale avait permis de confirmer l'activation astrocytaire. Ce travail avait donc montré que la spectroscopie de diffusion est sensible aux variations de morphologie de types cellulaires spécifiques (ici, les astrocytes) si des métabolites y diffusent préférentiellement.

L'encart de la figure 7-3 illustre le profil de diffusion du lactate dans chaque groupe. L'atténuation du signal du lactate est significativement plus faible chez les souris CNTF, et il en a été conclu que le lactate serait davantage compartimenté dans les neurones chez le groupe CNTF, contre une compartimentation à tendance plus astrocytaire chez les LACZ.

Nous nous proposons ici de poursuivre ces travaux, en étudiant de manière plus approfondie la diffusion du lactate dans le modèle d'activation astrocytaire induit par transfert de gène CNTF.

## **7.2. Protocole expérimental**

### *7.2.1. Protocole d'injection*

Le protocole d'injection des lentivirus reste relativement similaire à celui proposé par Ligneul et al., à savoir : les lenti-CNTF et lenti-LACZ ciblent les cellules du striatum, et sont injectés à deux groupes de souris, le groupe CNTF et le groupe LACZ.

La première différence survient ici : alors que l'injection était bilatérale (c'est-à-dire dans les deux hémisphères), nous avons choisi de n'injecter qu'un seul hémisphère. Nous avons en effet souhaité effectuer les mesures de diffusion dans un voxel le plus homogène possible en limitant la contribution des ventricules, et matière blanche. Les groupes ont ensuite été scannés de 2 à 9 mois après l'injection.

### 7.2.2. Protocole de RMN

Au cours d'une expérience, deux types de mesures étaient réalisées, similairement au protocole d'acquisition de l'étude APP/PS1 (chapitre 8) :

Des mesures à hautes valeurs de pondération en diffusion, avec la séquence SE-LASER PC (dont nous ne présenterons pas les résultats ici), puis avec la SE-LASER LSB, avec suppression de l'eau (VAPOR), sur 8 souris mâles de 6 à 9 mois post-injection, réparties en 4 souris CNTF et 4 souris LACZ (contrôle). Les paramètres de la SE-LASER LSB sont  $TE_{SE}/TE_{LASER}/TR = 58,4/25/2000$  ms et  $\delta = 3,1$  ms. 8 valeurs de  $b$  ont été choisies et sont les suivantes :  $b = 0,02 ; 0,5 ; 1,5 ; 3,02 ; 6 ; 10 ; 15$  et  $20$  ms/ $\mu\text{m}^2$ . Ces mesures ont été réalisées avec powder averaging et valeurs de  $b$  entrelacées. Chaque point de mesure correspond à la somme de 256 répétitions pour chaque animal.

Des acquisitions de spectres de macromolécules ont été effectuées pour chaque animal, selon les paramètres qui seront détaillés table 8.1.

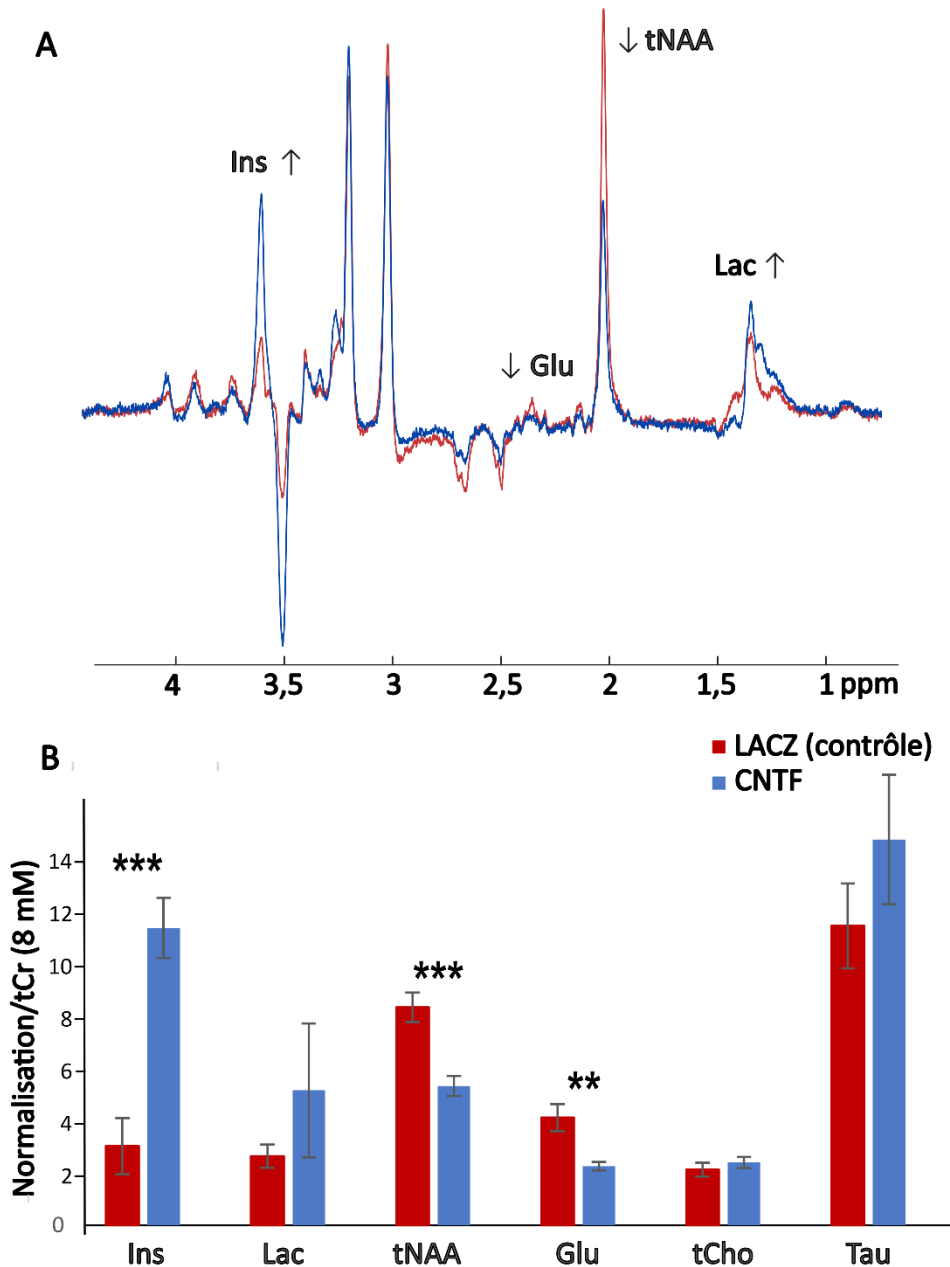
Puisque les animaux ont été injectés unilatéralement, les mesures ont été faites dans un voxel unilatéral autour du site d'injection (visible en imagerie les premières semaines post-injection) de  $3 \times 3 \times 2,8 = 25$   $\mu\text{L}$  et est illustré par l'encart de la figure 7-6. En comparaison avec l'étude de Ligneul et al., ce voxel est 60% plus petit, mais bien plus homogène, puisque nous limitons au maximum la contribution des ventricules. En contrepartie, le SNR est bien plus faible, mais l'utilisation d'une séquence d'écho de spin à la place d'un écho stimulé devrait compenser cette perte de signal.

## 7.3. Etude des métabolites intracellulaires

### 7.3.1. Profil spectroscopique et concentrations métaboliques

Nous avons sommé les spectres acquis à  $b_0$  avec la séquence SE-LASER LSB sur 4 souris du groupe CNTF et 4 souris du groupe LACZ, toutes injectées unilatéralement du même côté (figure 7-4-A). Les spectres issus du groupe CNTF sont particulièrement remarquables par l'allure du pic de *myo*-inositol à 3,56 ppm, bien plus intense que les autres métabolites, et caractéristique de la réactivité astrocytaire. Les concentrations ont été quantifiées avec LCModel (figure 7-4-B). Nous avons ici décidé de normaliser les concentrations à la créatine totale, comme on peut le retrouver en règle générale

dans la littérature. Cette décision se justifie par le fait que l'allure des macromolécules n'est pas comparable d'un groupe à l'autre, en particulier autour du pic de lactate à 1,3 ppm.



**figure 7-4** : A. Somme des spectres acquis sur 4 souris de chaque groupe (LACZ en rouge et CNTF en bleu) à  $b = 0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la SE-LASER LSB. A noter qu'aucune normalisation n'est effectuée sur les spectres. B. Concentrations normalisées par la créatine totale ( $tCr = 8 \text{ mM}$ ) issues de l'analyse LCModel de chaque spectre pour les deux groupes. (t-test de student, \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*  $p < 0,1$ )

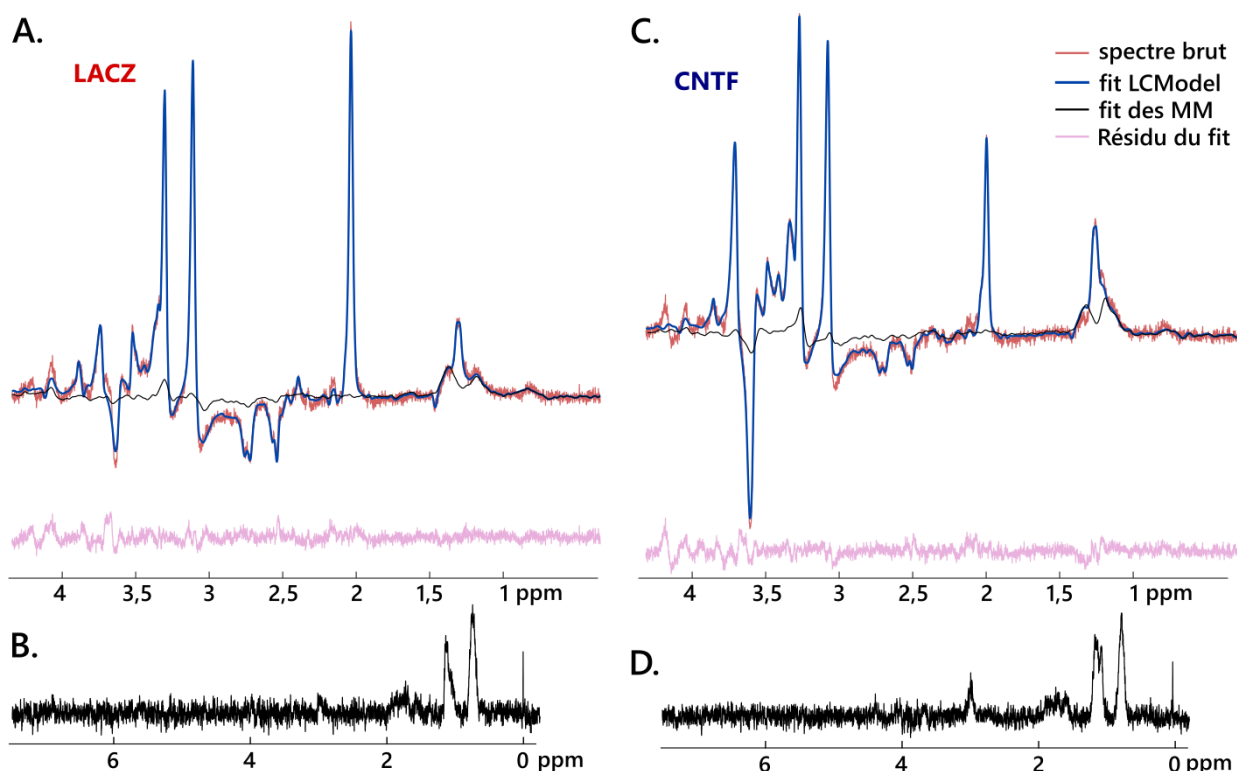
La concentration de *myo*-inositol augmente de façon drastique dans le groupe CNTF, augmentation cohérente avec une réactivité astrocytaire. Alors que Ligneul et al.

rapportaient une augmentation de concentration de 92%, elle est ici trois fois plus importante, soit de l'ordre de 275% environ. Cette différence peut être liée au délai écoulé entre l'injection et les mesures spectroscopiques. Similairement à cette étude, la concentration du NAA et du glutamate, métabolites principalement neuronaux, diminue de façon significative dans le groupe contrôle (respectivement -35% et -40%).

Les concentrations de lactate et de taurine semblent être plus importantes chez le groupe CNTF comparé au groupe contrôle, mais les résultats ne sont ici pas significatifs.

### 7.3.2. Macromolécules

Un spectre de macromolécules a été acquis lors de chaque expérience. Les spectres de macromolécules sont ici différents, comme l'avait observé Ligneul et al., comme nous pouvons le constater sur la figure 7-5, où un pic supplémentaire vers 1.2 ppm correspondrait à du béta-hydroxybutyrate (Ligneul et al., 2019; Urenjak et al., 1993).

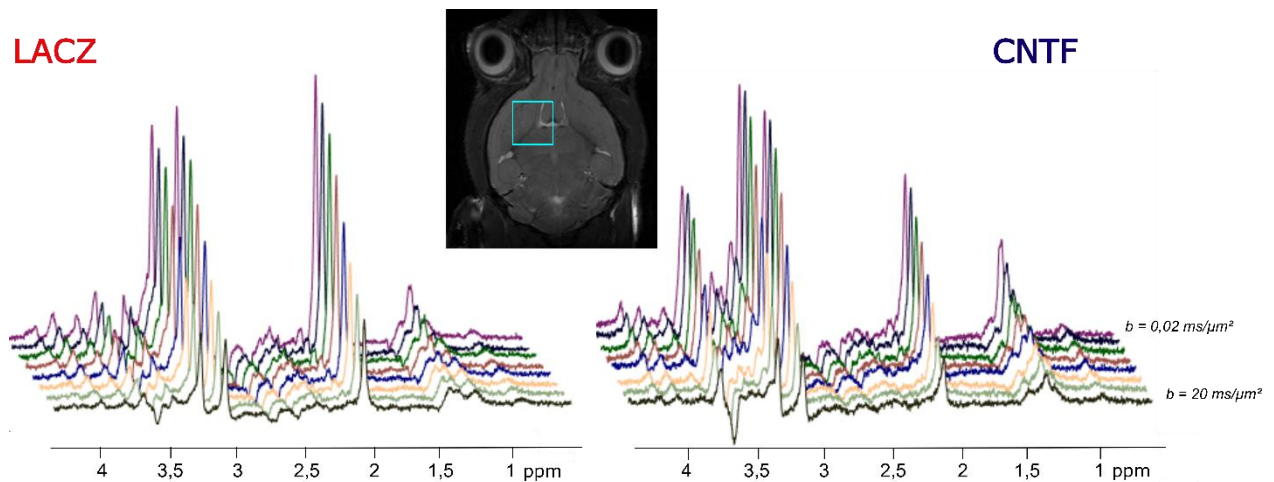


**figure 7-5** : spectres de métabolites sans pondération en diffusion (rouge), et fit LCMoDel (bleu) et fit des macromolécules (noir) correspondants, avec la séquence SE-LASER LSB pour le groupe LACZ (A.) et CNTF (C.) et bases de macromolécules incluses dans LCMoDel correspondantes (B et D respectivement). On peut observer une contribution supplémentaire aux alentours de 1,2 ppm.

Nous avons donc constitué deux bases de macromolécules différentes pour le groupe LACZ et le groupe CNTF, et les spectres de chaque groupe ont été *fittés* par LCModel avec la base de macromolécules correspondante.

### 7.3.3. Mesures aux hautes valeurs de $b$

Les spectres pondérés en diffusion et moyennés par groupes sont présentés figure 7-6. On peut noter dans le groupe CNTF la faible intensité du NAA comparé aux autres métabolites, et, à l'inverse, l'intensité particulièrement importante du myo-inositol, même aux plus hautes valeurs de pondération en diffusion.

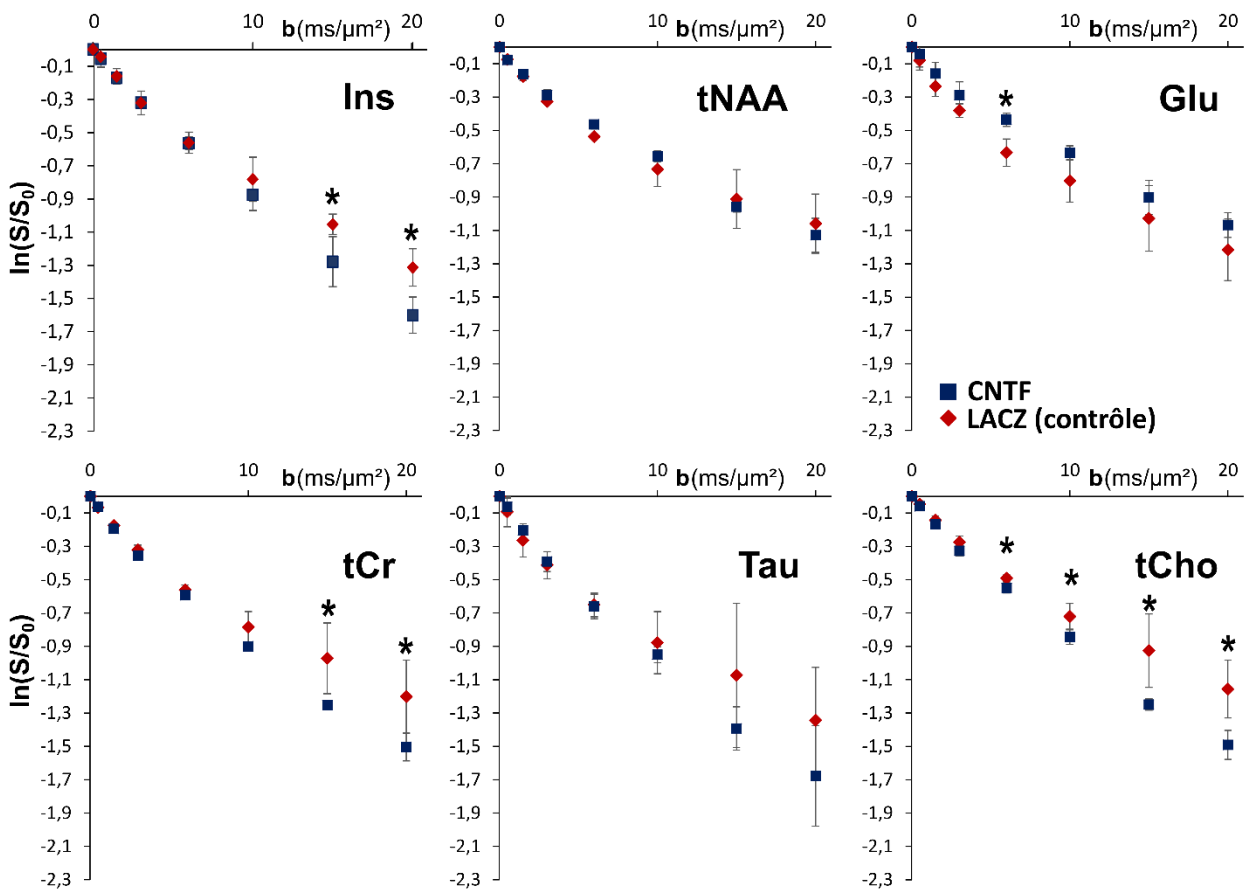


**figure 7-6** : Spectres acquis avec la séquence SE-LASER LSB pour 8 valeurs de  $b$  allant de 0,02  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  à 20  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ , dans le striatum de souris LACZ (contrôle) et CNTF. Les spectres ont été moyennés sur 5 animaux pour chaque groupe pour améliorer le SNR

L'atténuation du signal des métabolites intracellulaires a été tracée pour chaque groupe (figure 7-7). Le *myo*-inositol, la créatine totale et la choline totale présentent tous une atténuation significativement plus importante chez les souris du groupe CNTF. La taurine semble suivre la même tendance, même si ces résultats ne sont pas significatifs. Ces résultats sont cohérents avec une diffusion dans des compartiments plus larges propres à la réactivité astrocytaire, et sont en accord avec les résultats de Ligneul et al..

Bien que non significative, l'atténuation du signal du NAA et du glutamate

semble moins importante chez les souris CNTF, ce qui suggèrerait une altération neuronale.

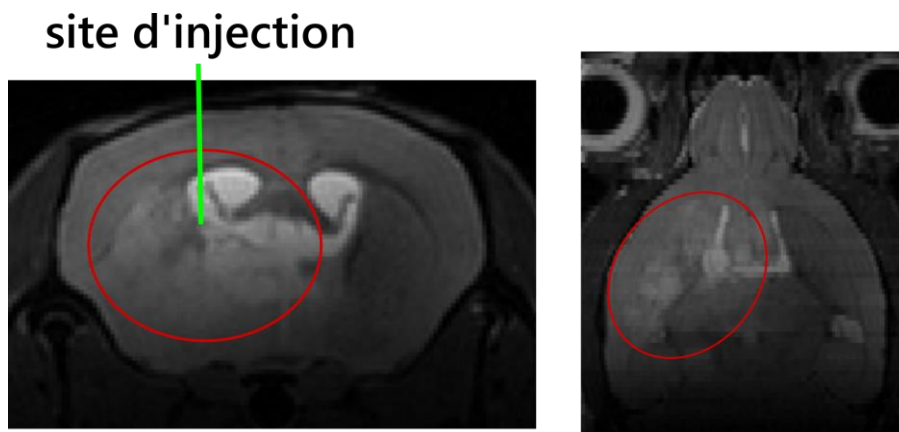


**figure 7-7** : Comparaison de l'atténuation du signal (moyenne sd sur 4 animaux) dans chaque groupe en fonction de  $b$  pour le myo-inositol, le tNAA, le glutamate, la créatine totale, la taurine, et la choline totale. L'atténuation du signal des métabolites principalement astrocytaires est significativement différente entre les deux groupes (t-test de Student, \* :  $p < 0,05$ ).

Sur les métabolites intracellulaires, nous retrouvons donc bien des résultats en accord avec ce qui avait été montré dans (Ligneul et al., 2019), et même plus : le NAA et le glutamate, métabolites essentiellement neuronaux, voient leur diffusion réduite, ce qui suggère une altération neuronale (atrophie ? Réduction de la diffusivité intraneuronale ?), tandis que la créatine et la choline totales adoptent le même comportement que l'inositol, ce qui suggère un gonflement glial suffisamment important pour impacter la fraction gliale de ces métabolites. Cet effet pourrait être dû à la taille et la composition du voxel, par rapport à l'étude de Clémence Ligneul qui se déroulait moins longtemps après le transfert de gènes, et dans un voxel plus gros.

#### 7.4. Une quantification du lactate compromise

Les animaux du groupe CNTF présentent tous, de façon plus ou moins marquée, un hypersignal autour du site d'injection sur les images anatomiques pondérées en T<sub>2</sub> effectuées pour placer le voxel de spectroscopie. Les images acquises chez un animal pour lequel cet effet est particulièrement important sont montrées à titre d'illustration figure 7-8.



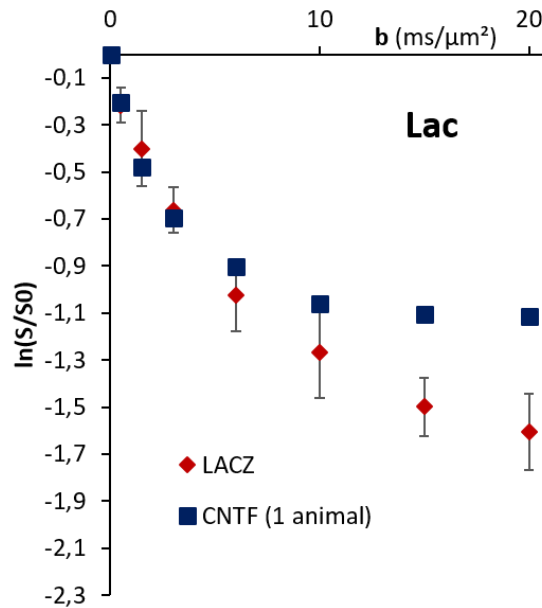
**figure 7-8** : images anatomiques acquises avec une pondération T<sub>2</sub> 6 mois après l'injection du lentivirus CNTF. La zone où l'on place le voxel de spectroscopie est remarquable par son hypersignal (cercles rouges).

Pour cet animal, l'atténuation du signal du pic de lactate, déterminé par LCModel est comparée à celle du groupe LACZ, est visible figure 7-9. A première vue, on retrouve des résultats similaires à ce que présentait Ligneul et al., avec un signal bien moins atténué chez l'individu CNTF. Les spectres acquis chez cet animal sans pondération en diffusion et à  $b$  plus élevée, et leurs décompositions sont visibles figure 7-10. En plus du petit pic à 1,2 ppm qui correspondrait à l'hydroxybutarate, on peut constater la présence d'un pic particulièrement intense au niveau de la résonance du lactate autour de 1,3 ppm, que l'on peut aisément confondre avec le lactate. Effectivement, les deux pics se superposent, et il est difficile d'établir la contribution de chaque composé au spectre.

Les informations recueillies en imagerie et spectroscopie suggèrent que ce pic supplémentaire correspond aux gouttelettes lipidiques (« lipid droplets ») associées aux tumeurs souvent reportées dans la littérature (Rémy et al., 1997), et dont la résonance est à 1,29-1,3 ppm (Craveiro et al., 2014; Lahrech et al., 2001). Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons effectué différentes expériences pour

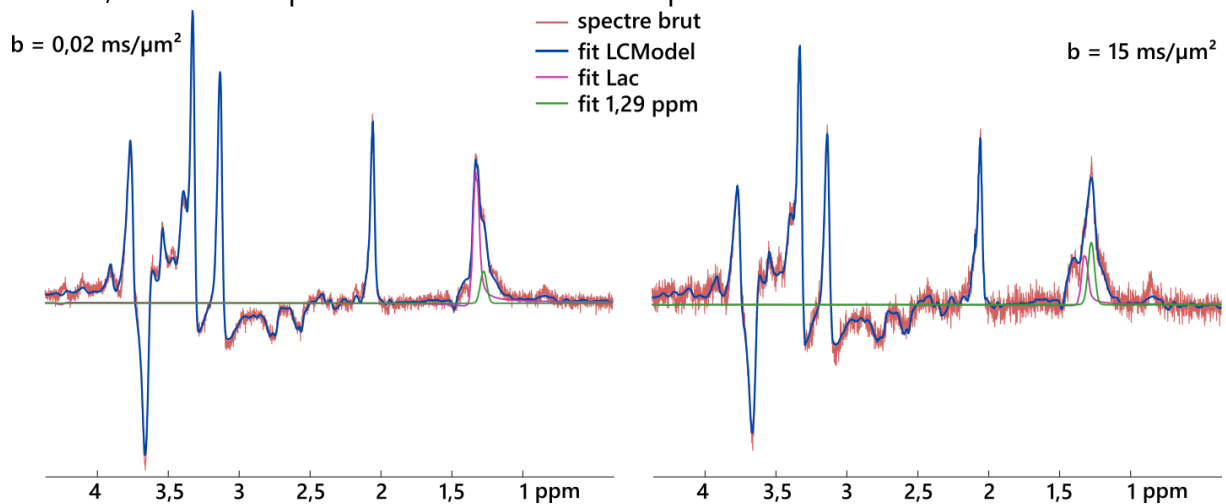


caractériser ce pic.



**figure 7-9** : atténuation du signal du lactate d'un animal comparé au groupe LACZ. L'allure est similaire à celle présentée par Ligneul et al.

Comme mentionné, le pic de lactate et ce pic à 1,29 ppm se superposant, il est difficile de distinguer leur contribution respective et donc de caractériser le nouveau pic. Nous avons vu au chapitre 4 que le choix de l'anesthésie influe grandement sur notre capacité à imager le lactate : avec une anesthésie à la médétomidine uniquement, le pic de lactate à 1,31 ppm est pratiquement indétectable. Bien que très contraignant dans le cadre des mesures de diffusion du lactate, nous pouvons ici utiliser cette particularité à notre avantage. En effet, si l'on arrive à faire « disparaître » le signal de lactate, alors il sera possible de caractériser ce pic.

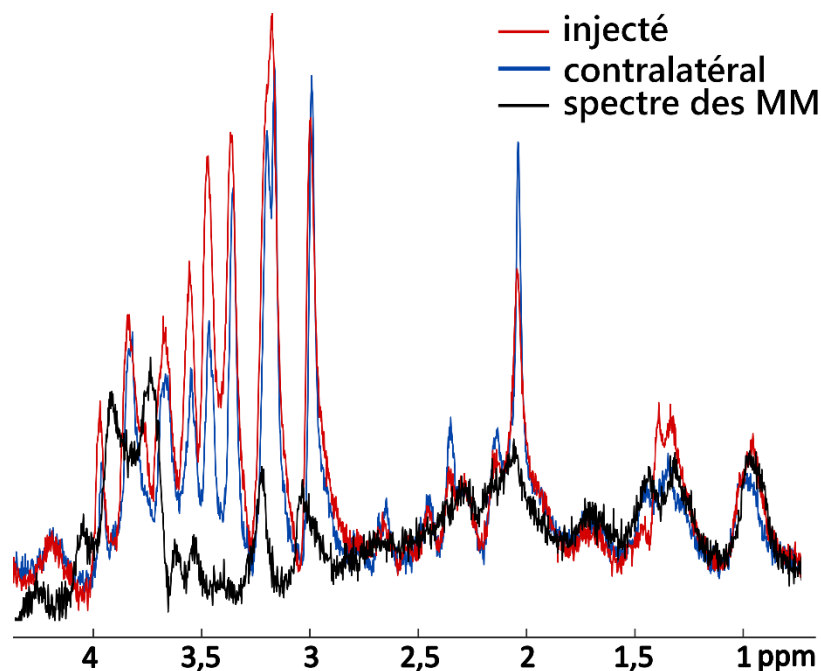


**figure 7-10** : spectres de métabolites (rouge) et décomposition LCMoDel du lactate (violet) et du composé résonnant à 1,29 ppm (vert), pour  $b = 0,02$  et  $15 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . Les deux pics violet et verts se superposent et leur contribution au spectre est difficile à établir.

Nous avons donc effectué différentes mesures chez un animal injecté unilatéralement depuis plus de 6 mois, anesthésié sous médétomidine uniquement. Le protocole d'anesthésie était alors similaire à celui utilisé pour les mesures invasives, c'est-à-dire :

- Induction à 4% d'isoflurane puis transition à 1,5%.
- Après installation de l'animal sur le lit, injection sous-cutanée du bolus de médétomidine (0,03 mg/kg)
- Transition progressive à 0% d'isoflurane
- Début de la perfusion sous-cutanée (0,6 mg/kg/h)

Nous avons placé un voxel similaire à celui présenté figure 7-6 au niveau du site d'injection. A titre de comparaison, nous avons également acquis un spectre sans pondération en diffusion dans un voxel placé en contralatéral. Les spectres, acquis avec la séquence LASER (donc sans bloc de diffusion), sont visibles figure 7-11.

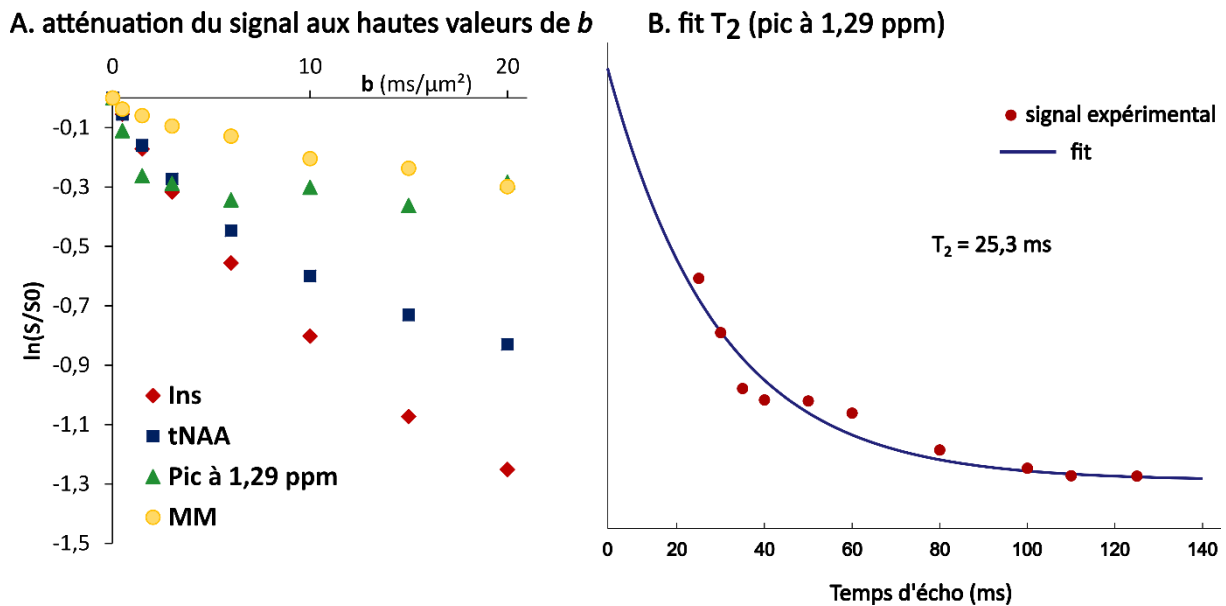


**figure 7-11** : spectres acquis sans pondération en diffusion avec la séquence LASER chez une souris injectée au CNTF depuis 12 mois, dans le striatum injecté (rouge) et contralatéral (bleu). Le spectre de macromolécules acquis du côté injecté est superposé aux spectres de métabolites. Autour de la résonance du lactate, on observe la présence d'un pic absent sur le spectre de macromolécules.

Nous retrouvons les mêmes différences d'intensité de pics de métabolites entre le côté injecté et le contralatéral qu'entre le groupe CNTF et LACZ, et on observe de façon très nette sur le spectre « injecté » (rouge) la présence d'un pic autour de 1,3

ppm absent de la base de macromolécules (en noir).

Des mesures à hautes valeurs de  $b$ , similairement à ce qui a été fait pour l'étude de la diffusion des métabolites, ont été effectuées. L'atténuation du signal du pic à 1,29 ppm est visible figure 7-12-A. Aux plus faibles valeurs de  $b$ , le signal s'atténue de façon similaire aux métabolites intracellulaires. Cependant, passé  $b = 1,5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , le signal ne s'atténue quasiment plus, de façon assez semblable aux macromolécules.



**figure 7-12** : A. Atténuation du signal du pic à 1,29 ppm, et des macromolécules ainsi que des métabolites intracellulaires principaux (à titre de comparaison). B. mesures à différents temps d'écho et *fit* des signaux pour estimer le temps de relaxation  $T_2$  du composé.

Afin de caractériser le temps de relaxation  $T_2$  du composé, nous avons également acquis des spectres avec la séquence LASER en faisant varier le temps d'écho. Les concentrations relatives du composé ont été estimées avec LCMModel, en considérant le pic comme une gaussienne, et les données ont été *fittées* pour en extraire un  $T_2$  égal à 25,3 ms. A titre de comparaison, les  $T_2$  des métabolites cérébraux à 11,7 T sont de l'ordre de 100-400 ms en fonction du métabolite (de Graaf et al., 2006). Selon la même étude, le  $T_2$  des macromolécules varie de 20 à 30 ms, ce qui signifie que le composé résonant à 1,29 ppm présente un  $T_2$  caractéristique des macromolécules. Cependant, son absence sur le spectre de macromolécules acquis en dIR témoigne d'un  $T_1$  différent des macromolécules, plus proche de celui des métabolites.

## 7.5. Discussion

Le modèle d'activation astrocytaire par transfert de gène CNTF chez la souris présente une hypertrophie locale des astrocytes, et les mesures de spectroscopie pondérée en diffusion témoignent des modifications de la géométrie des compartiments intracellulaires (Ligneul et al., 2019).

Cependant, nous avons constaté l'apparition, avec le temps post-injection, d'un nouveau composé par la présence sur les spectres d'un pic se superposant au pic de lactate. Les mesures effectuées sur ce pic ont permis de déterminer qu'il ne s'agissait ni d'un métabolite, ni de macromolécule, mais probablement de lipides. L'apparition simultanée d'un hypersignal autour du site d'injection peut nous indiquer la présence d'une masse tumorale. L'atténuation du signal de diffusion, qui atteint très rapidement un plateau, suggère que les lipides sont très restreints, comme encapsulés. Toutes ces informations convergent vers l'hypothèse de développement de tumeurs cérébrales accompagnées de gouttelettes lipidiques suite à l'injection de lenti-CNTF. Il est ici utile de remarquer que la littérature ne rapporte pas de lien entre transfert de gène CNTF et développement de tumeurs cérébrales. Cependant, il a été reporté que le CNTF serait impliqué dans des voies de signalisation liées au développement tumoral (Benigni et al., 1995; Lawrence et al., 1995). Il a également été montré une augmentation de la concentration en CNTF dans les tumeurs cérébrales humaines (Lilja et al., 2001).

Bien que le modèle CNTF soit un excellent modèle de réactivité astrocytaire, il semble qu'il ne soit pas stable dans le temps, puisqu'à partir de 6 mois post-injection, nous détectons des signes de masses tumorales très importants. La présence de lipides résonant à 1,29 ppm, associée à l'apparition des tumeurs, rend la quantification du lactate extrêmement délicate. Il semblerait que l'intensité du pic de lipide augmente avec la sévérité des tumeurs (Connolly et al., 2021; Valette et al., 2012). Il est donc possible que ce pic était déjà présent, mais d'intensité bien moindre, dans l'étude de Ligneul et al., et ait pu contribuer à un biais dans la mesure de diffusion du lactate. Devant cette incertitude, il n'est donc pas judicieux d'utiliser ce modèle pour étudier la compartimentation du lactate dans des cas de réactivité astrocytaire.

## **8. MODELE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : LE MODELE APP/PS1DE**

### **8.1. La maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est l'une des maladies neurodégénératives les plus fréquentes et préoccupantes du XXI<sup>ème</sup> siècle. Elle affecte principalement les fonctions cognitives, telles que la mémoire, la pensée, la planification, et la prise de décision, avec des conséquences dévastatrices sur la qualité de vie des patients et leur famille ; et touche plus de 35 millions de personnes dans le monde. En France, on compte plus de 900000 malades. Elle est très fréquente chez les personnes âgées puisque, au-delà de 80 ans on reporte qu'une femme sur quatre et un homme sur cinq sont atteints de la maladie (Lozano et al., 2012).

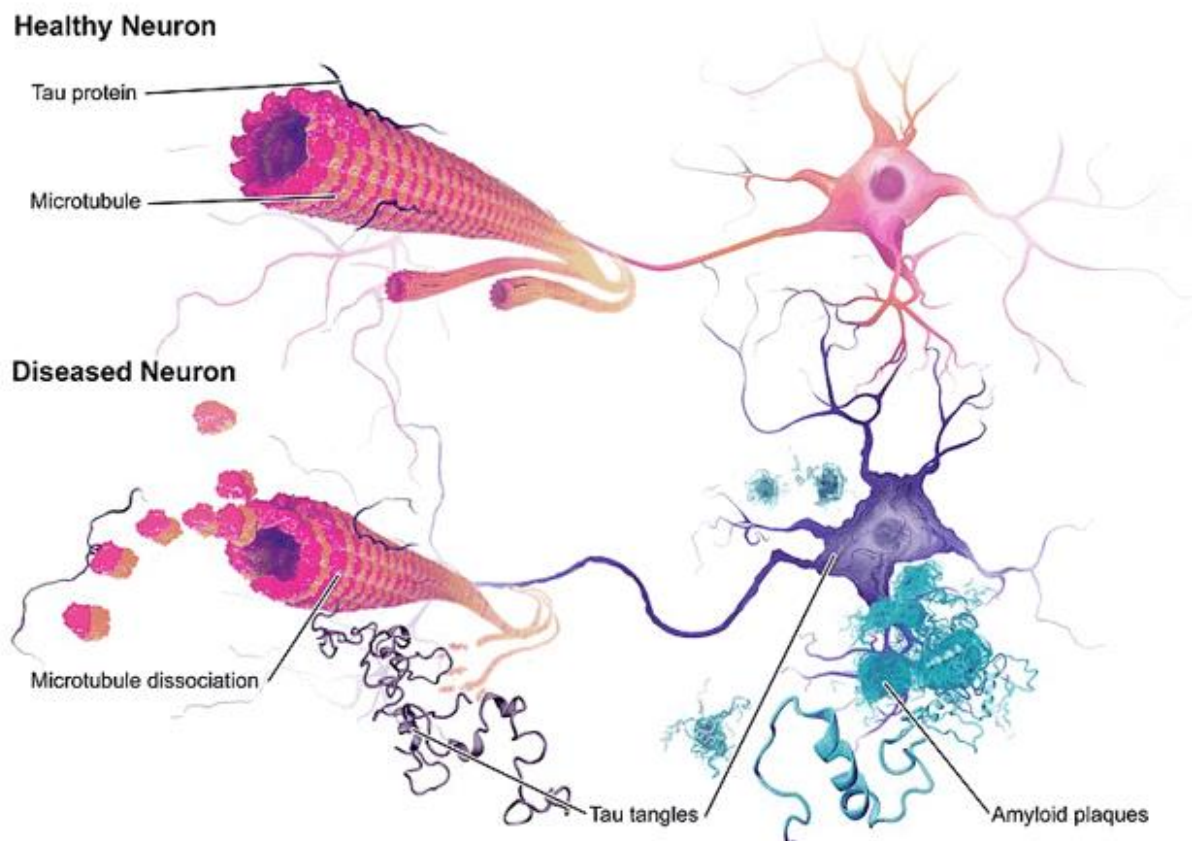
La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation de plaques amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau, et plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex. Ces altérations conduisent progressivement et de façon irréversible à la perte de mémoire et des fonctions cognitives en entraînant la mort des neurones dans les régions cérébrales associées (Fox & Yamamoto, 2015; Newington et al., 2013).

La pathologie de la maladie d'Alzheimer est due à un mauvais repliement de protéines, qui s'accumulent et forment des agrégats. Dans une cellule saine, les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme de la cellule à partir d'un ARN messager originaire du noyau. L'ARN messager est lu via le ribosome qui forme une chaîne d'acides aminés, ou polypeptides. Ces derniers se plient ensuite en une structure 3D fonctionnelle, la protéine. Un repliement incorrect des protéines est un phénomène cellulaire relativement courant, qui peut être induit par différents facteurs, comme une erreur transcriptionnelle, le stress, une mutation génétique. Dans ce cas la protéine malformée est normalement guidée vers le protéasome pour y être digérée en acides aminés (Ashrafian et al., 2021).

Dans la maladie d'Alzheimer, deux protéines ne se replient pas correctement et ne sont pas éliminées par le protéasome : les protéines bêta-amyloïdes ( $A\beta$ ) au niveau extracellulaire et Tau au niveau intracellulaire. Dans un cerveau sain, la protéine Tau est essentielle pour le bon fonctionnement des neurones en maintenant la stabilité des microtubules, en soutenant la structure neuronale, en facilitant le transport

intracellulaire et en participant à la régulation de la plasticité synaptique (Frost et al., 2009). La fonction précise de la protéine A $\beta$  n'est pas encore complètement comprise, mais elle joue un rôle dans la réponse immunitaire du cerveau, la régulation du transport des nutriments, et la plasticité synaptique (Karran et al., 2011; Soscia et al., 2010).

Dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer, les protéines A $\beta$  sont donc à l'origine de la formation des plaques amyloïdes, et les protéines Tau s'agrègent également anormalement et forment des enchevêtrements (Frost et al., 2009; Hung et al., 2016; Salehi et al., 2004). Ces agrégats protéiques s'accumulent entre les neurones sains et perturbent la transmission neuronale, conduisant irrémédiablement à une détérioration cérébrale et des pertes de fonctions neuronales (figure 8-1).

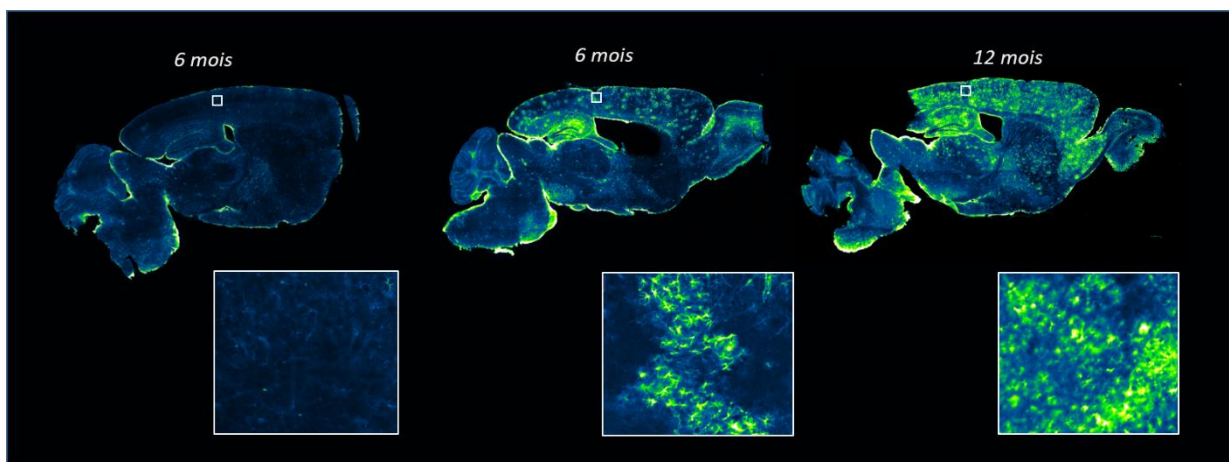


**figure 8-1** : Illustration de la neuropathologie de la maladie d'Alzheimer. Les protéines A $\beta$  forment des plaques amyloïdes dans le milieu extracellulaire, et les protéines Tau ne remplissent plus leur rôle de maintien de la stabilité des microtubules et s'agrègent dans le milieu intracellulaire, conduisant à terme à la mort neuronale

## 8.2. Le modèle APP/PS1dE9

Dans la littérature, les principaux modèles murins utilisés pour étudier la maladie d'Alzheimer sont le modèle 3xTG-AD et le modèle APP/PS1. Au laboratoire, nous élevons la lignée APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup>, et c'est le modèle sur lequel nous avons basé ces études.

Le modèle APP/PS1 est un modèle hétérozygote de souris transgénique développé pour reproduire l'accumulation de plaques A $\beta$ . Ce modèle combine la surexpression de deux gènes humains mutés : le gène précurseur de la protéine A $\beta$  (APP pour amyloid precursor protein), et le gène PS1 (pour Presenilin-1) qui lui est associé à la formation de plaques A $\beta$ . Dans des neurones sains, la protéine APP va être digérée par les enzymes alpha et gamma sécrétase à l'extérieur de la cellule. La digestion produit des polypeptides solubles qui seront recyclés par la cellule. Il s'agit de la voie dite non amyloïde. Lorsque le gène APP muté est surexprimé, l'APP emprunte la voie amyloïde : la beta sécrétase remplace l'alpha sécrétase, et la réaction de digestion produit un peptide insoluble, l'A $\beta$ .



**figure 8-2** : immunohistochimie contre la GFAP sur des coupes de cerveau (45 $\mu$ m) de souris contrôle (gauche, âgée de 6 mois) et APP/PS1 (milieu à 6 mois et droite à 12 mois). Les cellules positives au GFAP (en vert) sont entourées de plaques A $\beta$ . Les images en bas correspondent au zoom des régions corticales marquées par un carré. Les coupes et images ont été effectuées par Rodrigo Lerchundi.

Les souris APP/PS1 expriment un phénotype pathologique très tôt, comme l'accumulation des plaques dans le cortex (Garcia-Alloza et al., 2006; Minkeviciene et al., 2008) et l'apparition de gliose dès 6 mois, illustrée par la figure 8-2 (Jackson et al., 2013; Kamphuis et al., 2012; Malm et al., 2007; Verkhratsky et al., 2019). Ce modèle présente également un déficit cognitif progressif et une perte synaptique (Hong et al.,

2016), et il a été constaté une récurrence de crises d'épilepsie (Minkeviciene et al., 2009) entre 2 et 6 mois qui conduisent, au sein du laboratoire, à un taux de mortalité avant 6 mois d'environ 10 à 20%.

### **8.3. Mesures préliminaires**

#### *8.3.1. Protocole expérimental*

Les souris sont nées et ont été élevées au sein du laboratoire. Les animaux ont été sevrés à 21 jours puis identifiés et génotypés par RT-PCR à l'âge de 2 mois. L'identification se fait par tatouage de la queue. Nous préférons cette méthode à l'identification par puce pour éviter les éventuels artefacts liés à la présence d'une puce. Puisque nous effectuons le prélèvement pour le génotypage en même temps que l'identification, le tatouage se fait ici sur souris anesthésiée à l'isoflurane. L'identification n'a lieu que plusieurs semaines après le sevrage puisqu'il faut que la queue de l'animal atteigne un diamètre suffisant. Les animaux contrôles et APP/PS1 sont des souris mâles qui proviennent des mêmes portées.

Lorsqu'elles atteignent 12 mois, les souris destinées aux mesures RMN sont scannées sous 1% d'isoflurane. Il est important de conserver la même concentration d'isoflurane au cours de l'expérience et d'un animal à l'autre pour ne pas biaiser la comparaison puisque, comme mentionné plus haut, la concentration de lactate varie avec l'utilisation d'anesthésiques volatiles tels l'isoflurane (Horn & Klein, 2010; Valette et al., 2007). Une expérience dure en moyenne deux heures. Il est difficile de rallonger cette durée puisque les APP/PS1 présentent un phénotype dommageable et fragile, et une surexposition à l'anesthésie augmente le risque de mortalité. Si nécessaire, les animaux sont scannés plusieurs fois, en espaçant les mesures d'au moins deux semaines afin de leur laisser le temps de se remettre totalement de l'anesthésie. Certains animaux ont été scannés à 18 mois, une fois l'impulsion « long single band » implémentée, en suivant le même protocole.

Dans ce travail, trois différentes mesures ont été réalisées à l'IRM :



- Des mesures à hautes valeurs de pondération en diffusion en utilisant la séquence SE-LASER PC, sur 10 souris mâles âgées de 12 mois, réparties en 5 souris APP/PS1 et 5 souris contrôle. Les paramètres de la SE-LASER PC sont  $TE_{SE}/TE_{LASER}/TR = 58,4/25/2000$  ms et  $\delta = 3,1$  ms. 4 valeurs de  $b$  ont été choisies et sont les suivantes :  $b = 0,02 ; 3,02 ; 10$  et  $20$  ms/ $\mu\text{m}^2$ .

- Des mesures à hautes valeurs de pondération en diffusion en utilisant la séquence SE-LASER long single band avec suppression de l'eau (VAPOR), sur 10 souris mâles âgées de 15 à 18 mois, réparties en 5 souris APP/PS1 et 5 souris contrôle. Les paramètres de la SE-LASER LSB sont  $TE_{SE}/TE_{LASER}/TR = 58,4/25/2000$  ms et  $\delta = 3,1$  ms. 8 valeurs de  $b$  ont été choisies et sont les suivantes :  $b = 0,02 ; 0,5 ; 1,5 ; 3,02 ; 6 ; 10 ; 15$  et  $20$  ms/ $\mu\text{m}^2$ .

Ces deux types de mesures ont été réalisées avec powder averaging et valeurs de  $b$  entrelacées. Chaque point de mesure correspond à la somme de 256 répétitions pour chaque animal.

- Des mesures en double encodage en diffusion en utilisant la séquence DDE-LASER, sur 8 souris mâles âgées de 12 mois, réparties en 4 souris APP/PS1 et 4 souris contrôle. Les paramètres de la DDE-LASER sont  $TE_{SE}/TE_{LASER} = 119/25$  ms,  $\delta /TM/TR = 3,1/25/2000$  ms. 5 angles ont été choisis et sont les suivantes :  $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ , et  $180^\circ$ . Ces mesures ont été réalisées avec powder averaging et suppression de l'eau, pour une pondération en diffusion  $b = 7,5$  ms/ $\mu\text{m}^2$  pour chaque bloc de diffusion, soit un total de  $b_{tot} = 15$  ms/ $\mu\text{m}^2$ . Des acquisitions à  $b_{0tot} = 0,04$  ms/ $\mu\text{m}^2$  ont également été effectuées afin de pouvoir déterminer l'atténuation du signal. Chaque point de mesure correspond également à la somme de 256 répétitions pour chaque animal.

### 8.3.2. Profil spectroscopique

#### 8.3.2.1. Voxel cortical et concentrations métaboliques

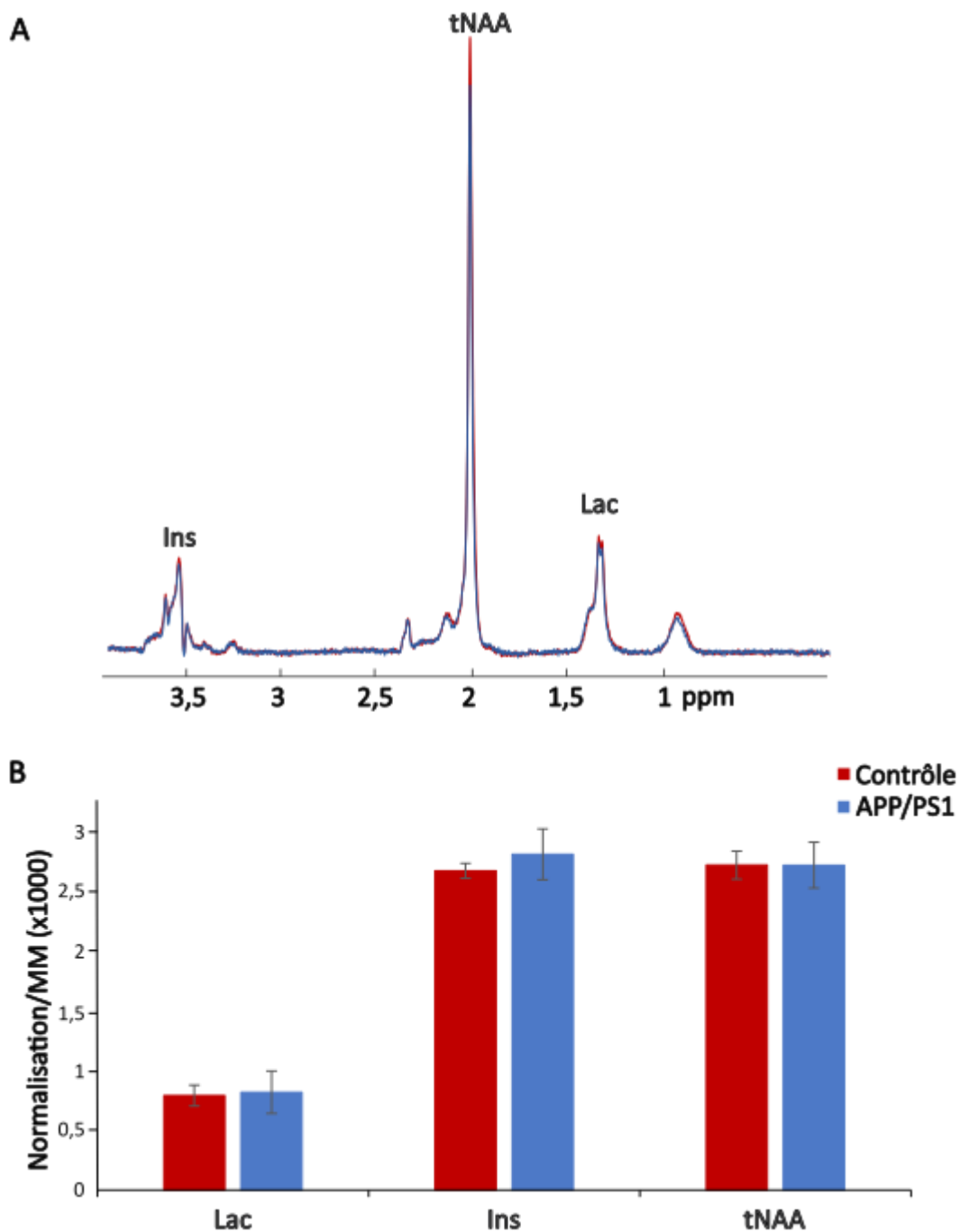
Puisque le phénotype pathologique des APP/PS1 se développe principalement dans le cortex et l'hippocampe, nous avons d'abord choisi d'effectuer les mesures de diffusion dans l'hippocampe. Cependant, les mesures par microélectrodes semblaient montrer des niveaux de lactate très fluctuants. Nous avons donc décidé d'explorer un voxel cortical de  $5 \times 1 \times 3$  mm<sup>3</sup>, illustré par l'encart de la figure 8-7.

Nous avons sommé les spectres acquis avec la séquence SE-LASER pc à  $b_0$  sur 6

souris de chaque groupe âgées de 12 mois (figure 8-3-A). Les concentrations des métabolites ont été quantifiées avec LCModel (figure 8-3-B). Habituellement, puisque les concentrations obtenues sont relatives, il est de coutume de normaliser par la concentration de créatine totale, que l'on considère comme métabolite de référence en spectroscopie. Cependant ici, avec l'utilisation de l'impulsion polychromatique, seuls l'inositol, le NAA, le lactate, et un pic de macromolécules sont refocalisés. Nous n'avons pas de pic de créatine à utiliser comme référence. Les macromolécules étant très stables d'un groupe à l'autre (cf. paragraphe 8.3.2.1), nous avons donc décidé de normaliser les concentrations relatives des métabolites d'intérêt par celles des macromolécules.

Bien que la littérature rapporte chez les APP/PS1 des concentrations de NAA plus faibles (Sabbagh et al., 2013), et un niveau de lactate plus élevé (Newington et al., 2013), nous trouvons des concentrations relativement similaires pour le tNAA et le lactate entre les deux groupes, même si visuellement le pic de NAA est plus intense pour le groupe contrôle comparé au groupe APP/PS1. Enfin, la concentration d'inositol semble être légèrement plus élevée (visuellement et après quantification par LCModel), même si non significativement, ce qui est cohérent avec une activation astrocytaire chez les souris APP/PS1, déjà observée dans la littérature (Jackson et al., 2013; Kamphuis et al., 2012; Malm et al., 2007; Verkhatsky et al., 2019).

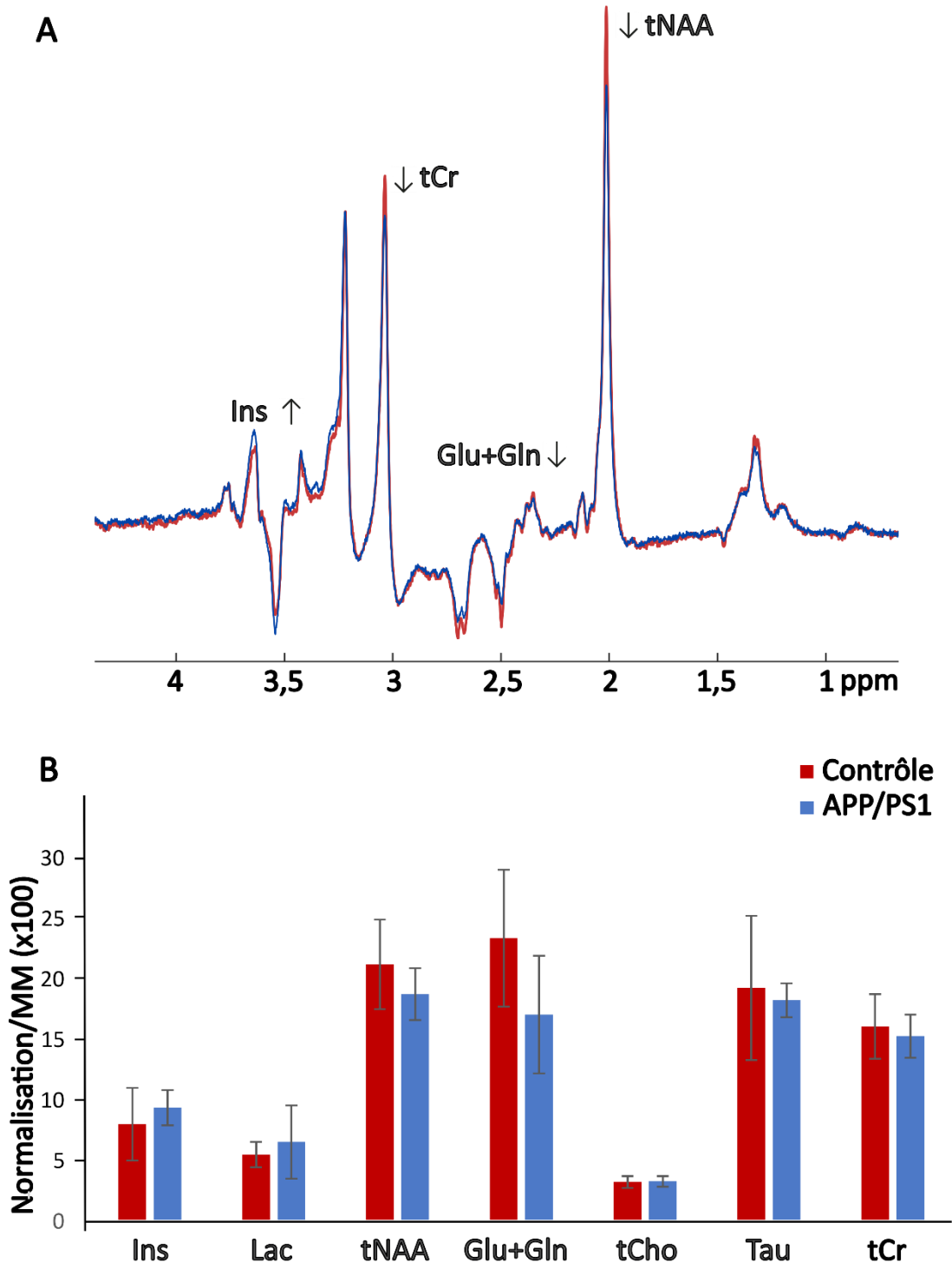
Comme détaillé chapitre 5.1, l'impulsion polychromatique est peu stable au cours d'une expérience, et certains pics peuvent perdre en intensité au cours du temps, ce qui peut donc expliquer ce manque de sensibilité aux variations en concentrations que l'on s'attendrait à retrouver.



**figure 8-3** : A. Somme des spectres acquis sur 6 souris de chaque groupe (Contrôle en rouge et APP/PS1 en bleu) à  $b = 0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la SE-LASER pc. A noter qu'aucune normalisation n'est effectuée sur les spectres. B. Concentrations normalisées par les MM issues de l'analyse LCMoDel de chaque spectre pour les deux groupes. Les différences ne sont pas significatives.

Nous avons reproduit ces mesures de la même façon, avec la séquence SE-LASER LSB sur 6 souris de chaque groupe, âgées de 15 à 18 mois (figure 8-4-A). Dans un souci de comparaison par rapport aux mesures à 12 mois, les concentrations des

métabolites ont également été quantifiées puis normalisées par les macromolécules (figure 8-4-B).



**figure 8-4** : A. Somme des spectres acquis sur 6 souris de chaque groupe (Contrôle en rouge et APP/PS1 en bleu) à  $b = 0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  avec la SE-LASER LSB. Aucune renormalisation n'est effectuée sur les spectres. B. Concentrations normalisées par les MM issues de l'analyse LCModel de chaque spectre pour les deux groupes. Les différences ne sont pas significatives.

Aucune variation significative des concentrations n'apparaît. Nous pouvons cependant noter que les spectres ont des allures différentes au niveau des pics de créatine et choline. Alors que le pic de choline est moins intense que le pic de créatine dans le groupe contrôle, cette tendance semble disparaître dans le groupe APP/PS1 pour tendre vers deux pics d'intensité similaire. Le pic de créatine est donc moins intense chez les souris du groupe APP/PS1 comparé au groupe contrôle. C'est également le cas du pic de NAA. Le pic d'inositol semble lui aussi être plus intense dans le groupe APP/PS1. On note également une légère augmentation de lactate, non significative, qui peut être justifiée par une altération du métabolisme ou tout simplement la sensibilité à l'isoflurane.

On peut également noter une diminution non significative de la concentration de glutamate et de NAA dans le groupe APP/PS1 comparé au groupe contrôle, que l'on pourrait associer à une éventuelle altération du métabolisme neuronal. Cette hypothèse justifie également le fait que les différences de concentration ne sont pas significatives : les animaux étant âgés de 15 à 18 mois, les souris du groupe contrôle pourraient être sensibles aux déficits cognitifs lié à l'âge, rendant leur métabolisme plus proche de celui des souris APP/PS1.

#### 8.3.2.2. Macromolécules

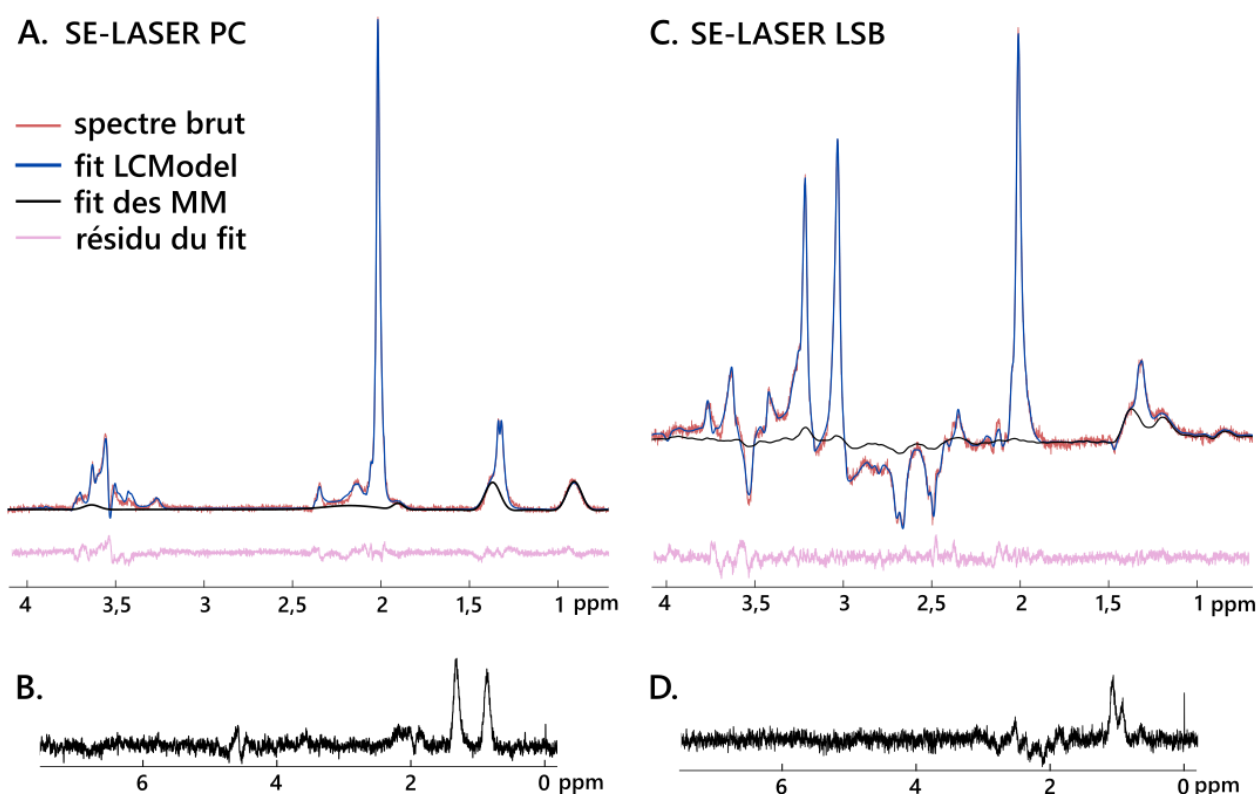
Un spectre de macromolécules a été acquis au début ou à la fin de chaque expérience. La même séquence que celle utilisée pour étudier les métabolites a été utilisée, à laquelle nous avons rajouté un module de double inversion récupération (dIR, détaillé chapitre 4). Le temps de répétition TR est fixé à 4000 ms, et les paramètres sont détaillés table 8-1.

	SE-LASER PC	SE-LASER LSB	DDE-LASER
impulsion	Polychromatique	Long Single Band	Adiabatique
Temps d'inversion (T11/T12 (ms) )	2200/770	2200/770	2200/730
Nombre d' <i>average</i> par animal	4x64 (sommés en post-processing)	256	256

table 8-1 : paramètres d'acquisition des spectres de macromolécules pour les trois séquences utilisées dans cette étude.

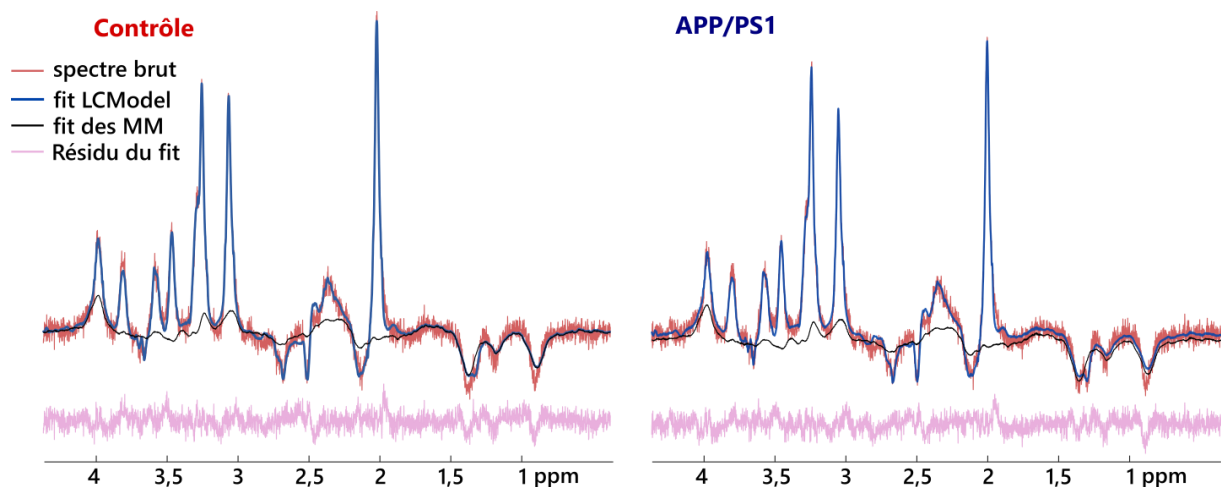
Aucune différence entre les groupes n'a été observée pour les spectres de macromolécules, que ce soit avec la séquence DDE-LASER ou SE-LASER PC à 12 mois

ou avec la SE-LASER LSB à 18 mois. Ils ont donc été regroupés pour augmenter le SNR. Les bases de macromolécules acquises pour les deux séquences SDE et incluses dans LCModel sont visibles sur la figure 8-5-B et D. Les *fits* correspondant obtenus *via* LCModel sont également visibles : que ce soit avec l'impulsion polychromatique (A.) ou la « long single band » (C.), le fit des macromolécules est excellent, en particulier au niveau du pic de lactate à 1,31 ppm.



**figure 8-5** : spectres de métabolites sans pondération en diffusion (rouge), et fit LCModel (bleu) et fit des macromolécules (noir) correspondants, avec la séquence SE-LASER PC (A.) et LSB (C.) et bases de macromolécules incluses dans LCModel correspondantes (B et D respectivement). Le résidu du fit (en violet) démontre un excellent fit des macromolécules

Pour la DDE, le *fit* des macromolécules, en particulier aux pondérations plus importantes, n'est pas très bon, comme on peut le constater autour des résonances à 0,9 ppm et 1,3 ppm (figure 8-6). Le résidu du fit confirme cette constatation : autour du pic de lactate à 1,31 ppm, les résidus sont plus irréguliers, et surtout ont un profil différent entre le groupe contrôle et le groupe APP/PS1. Nous verrons chapitre 8.6 que cette imprécision sur le *fit* pose problème pour la quantification du lactate.



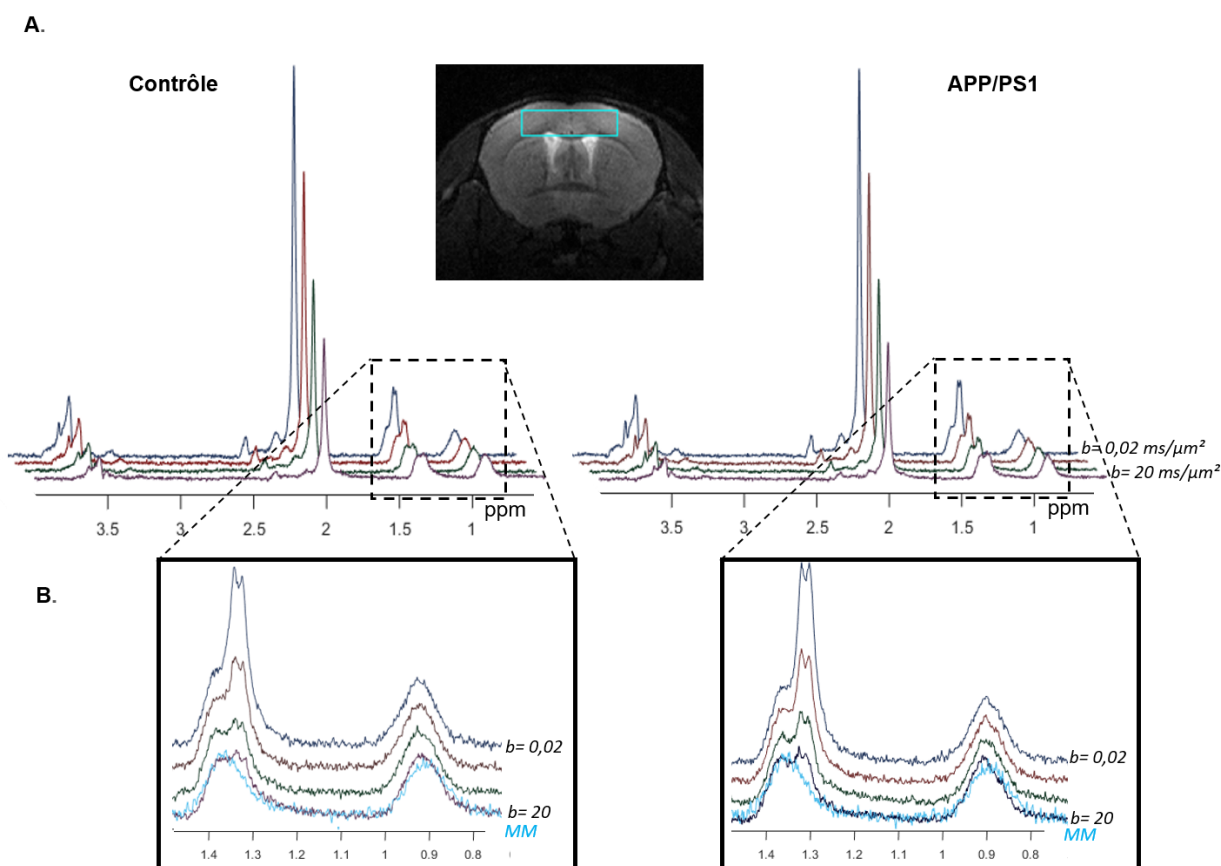
**figure 8-6** : spectres moyennés sur 4 animaux de chaque groupe pour  $b = 15 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  ( $2 \times 7,5$ ) et  $\theta = 180^\circ$  (rouge), et fit LCMoDel (bleu) et des macromolécules (noir) correspondants. Le résidu du fit (violet) est irrégulier entre les deux groupes, surtout aux alentours de 1,3 ppm.

## 8.4. Mesures de diffusion à 12 mois avec la SE-LASER polychromatique

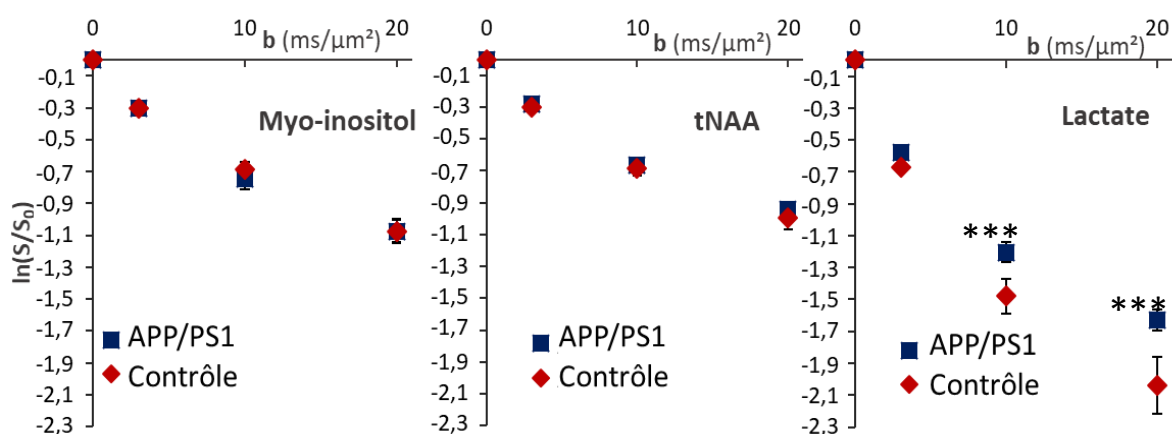
### 8.4.1. Mesures aux hautes valeurs de $b$

Les spectres pondérés en diffusion et moyennés par groupe sont présentés figure 8-7-A. On constate que même aux plus hautes valeurs de pondération en diffusion, le pic de lactate à 1,31 ppm reste clairement visible, et semble diminuer de façon un peu plus importante dans le groupe contrôle (figure 8-7-B).

Les atténuations moyennes des signaux sont présentées dans la figure 8-8. L'atténuation des signaux de l'inositol et du NAA varie peu entre les groupes. Sur l'ensemble du voxel, il semblerait donc que les métabolites purement intracellulaires diffusent dans des compartiments inchangés entre les deux groupes. Le signal du lactate, quant à lui, est significativement moins atténué chez les souris APP/PS1. Puisque les microstructures astrocytaires et neuronales restent globalement inchangées chez les souris APP/PS1, cela suggère que la diffusion plus lente du lactate pourrait-être due soit à une plus petite fraction de lactate extracellulaire, puisque la diffusion est plus rapide dans l'espace extracellulaire, soit à une diffusion entravée dans l'espace extracellulaire en raison de la présence d'agrégats de plaques  $A\beta$ .



**figure 8-7 :** A. Spectres acquis avec la séquence SE-LASER polychromatique pour des valeurs de  $b$  allant de  $0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  à  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , dans le cortex de souris contrôle et APP/PS1 âgées de 12 mois. Les spectres ont été moyennés sur 5 animaux pour chaque groupe pour améliorer le SNR. B. Zoom autour du pic de lactate. Le spectre de macromolécules superposé aux spectres à plus haute valeur de  $b$  illustre l'excellent fit des macromolécules et du lactate.

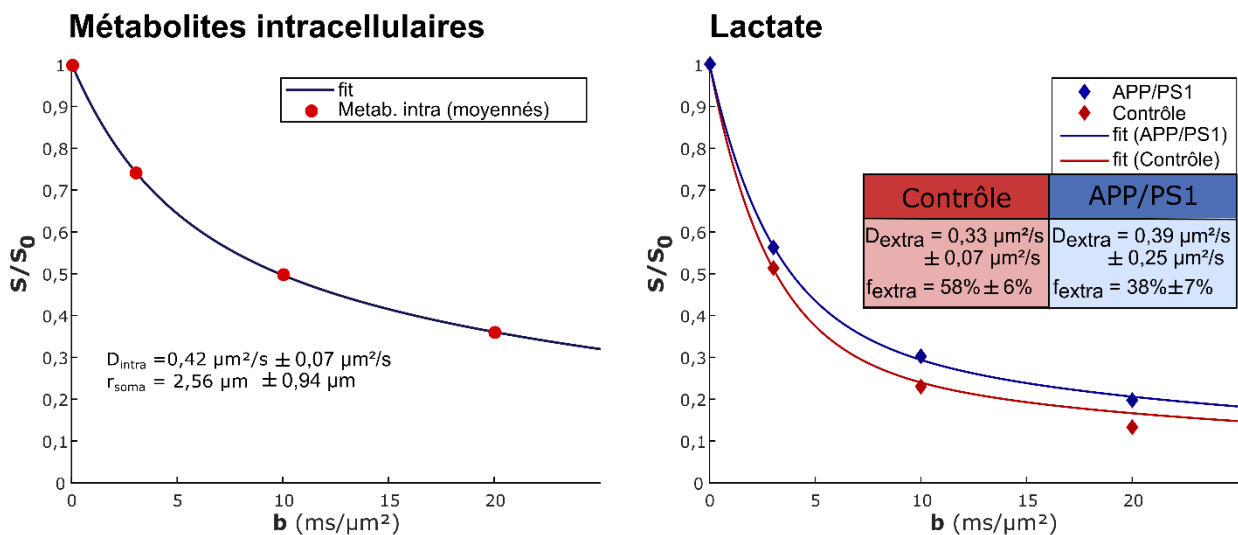


**figure 8-8 :** Comparaison de l'atténuation du signal (moyenne sd sur 6 animaux dans chaque groupe en fonction de  $b$  pour le myo-inositol, le tNAA et le lactate. L'atténuation du signal du lactate est significativement différente entre les deux groupes (T-test de Student, \*\*\* :  $p < 0,001$  après correction de Bonferroni).



### 8.4.2. Modélisation des résultats

Afin de répondre à cette problématique, nous avons modélisé les signaux pondérés en diffusion du NAA et du *myo*-inositol, en utilisant le modèle de sphères+cylindres décrit chapitre 6. Cela nous a permis d'estimer la microstructure cellulaire et ensuite de prédire la diffusion du lactate dans l'espace intracellulaire. Dans ce travail, comme on peut le constater sur la figure 8-8, les signaux du tNAA et de l'inositol semblent trop similaires pour différencier la diffusion astrocytaire de la diffusion neuronale. Nous avons donc décidé de moyenniser les quatre signaux intracellulaires (tNAA et Ins dans les deux groupes) pour extraire des paramètres moyens des microstructures cellulaires, à savoir rayons des fibres et du corps cellulaire, ainsi que la diffusivité intracellulaire moyenne (figure 8-9, gauche).



**figure 8-9** : fit de l'atténuation du signal moyenné pour l'Ins et le tNAA pour les deux groupes avec le modèle à deux compartiments sphères+cylindres (gauche), et de l'atténuation du signal du lactate pour chaque groupe (droite) en utilisant un modèle de deux compartiments sphères+cylindres (intra et extracellulaire) incluant les paramètres déterminés à gauche, et où  $f_{extra}$  et  $D_{extra}$  sont laissés libres. La déviation standard a été estimée à l'aide d'une approche de Monte Carlo (n=1000 essais).  $D_{extra}$  reste relativement inchangée (mais estimée de manière très imprécise) tandis que  $f_{extra}$  diminue d'environ 35 % chez les APP/PS1.

Le signal du lactate a ensuite été *fitté* pour chaque groupe à l'aide d'un modèle à deux compartiments qui représente les espaces intra- et extra-cellulaires. On suppose une diffusion gaussienne dans l'espace extracellulaire et on laisse la fraction extracellulaire  $f_{extra}$  et la diffusivité extracellulaire  $D_{extra}$  comme paramètres libres (figure 8-9, droite). La déviation standard a été estimée à l'aide d'une approche de Monte Carlo (n=1000 essais). La modélisation donne une  $D_{extra}$  relativement inchangée (et

surtout estimée avec une mauvaise précision) mais une  $f_{\text{extra}}$  nettement plus faible dans le groupe APP/PS1.

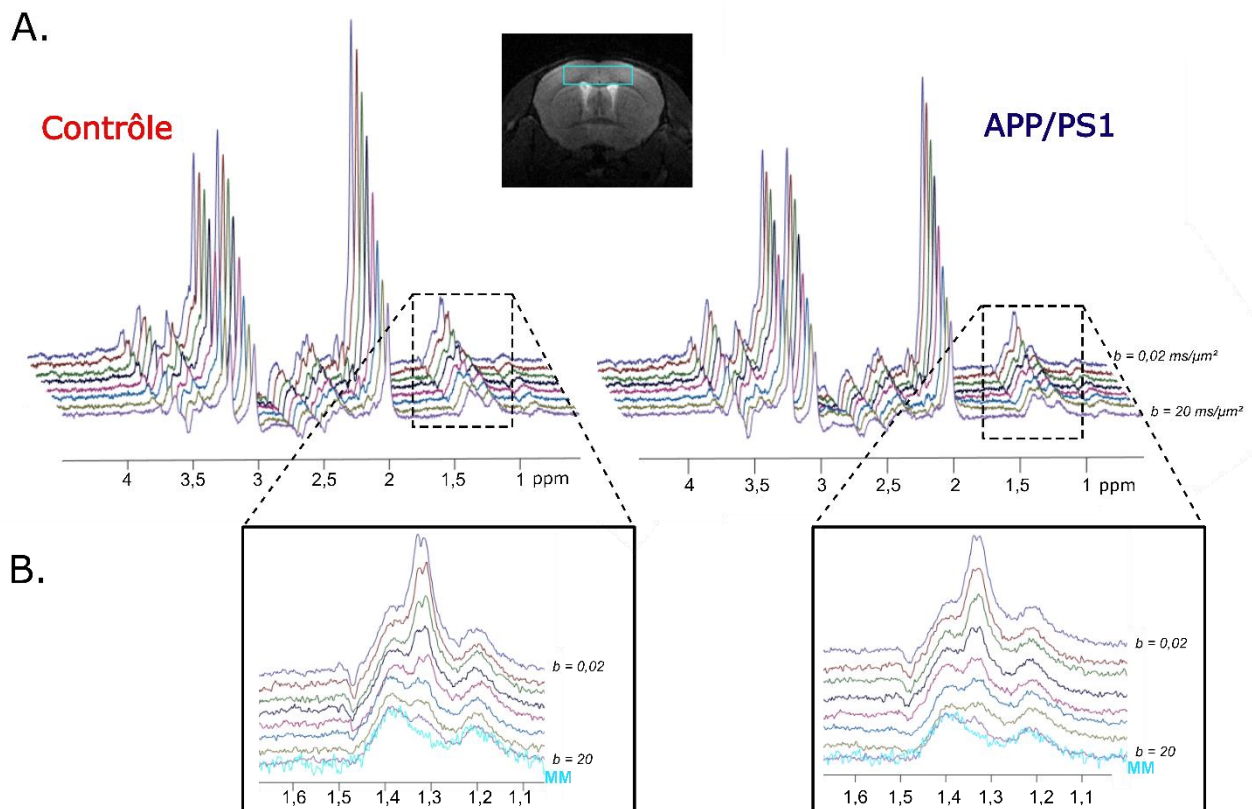
En définitive, la diminution de la fraction extracellulaire de lactate peut être due soit à une diminution de la fraction occupée par volume extracellulaire, soit à une diminution de la concentration de lactate dans l'espace extracellulaire. Pour déterminer l'hypothèse la plus susceptible d'expliquer cette variation, des mesures de la concentration de lactate dans l'espace extracellulaire à l'aide d'électrodes enzymatiques implantées (et aussi dans l'espace intracellulaire à l'aide de fibre optique implantée) ont été faites et sont présentées chapitre 8.7.

## **8.5. Mesures de diffusion à 18 mois avec la SE-LASER LSB**

### *8.5.1. Aux hautes valeurs de $b$*

Comme détaillé chapitre 5, l'impulsion polychromatique utilisée présente des limites importantes dans sa sensibilité. Pour s'affranchir de cette trop forte sensibilité, nous avons donc développé l'impulsion « long single band » au cours de la thèse. Nous avons donc reproduit les mesures présentées chapitre 8.4 avec cette nouvelle impulsion, et avons augmenté le nombre de points de mesures afin de rendre la modélisation plus robuste.

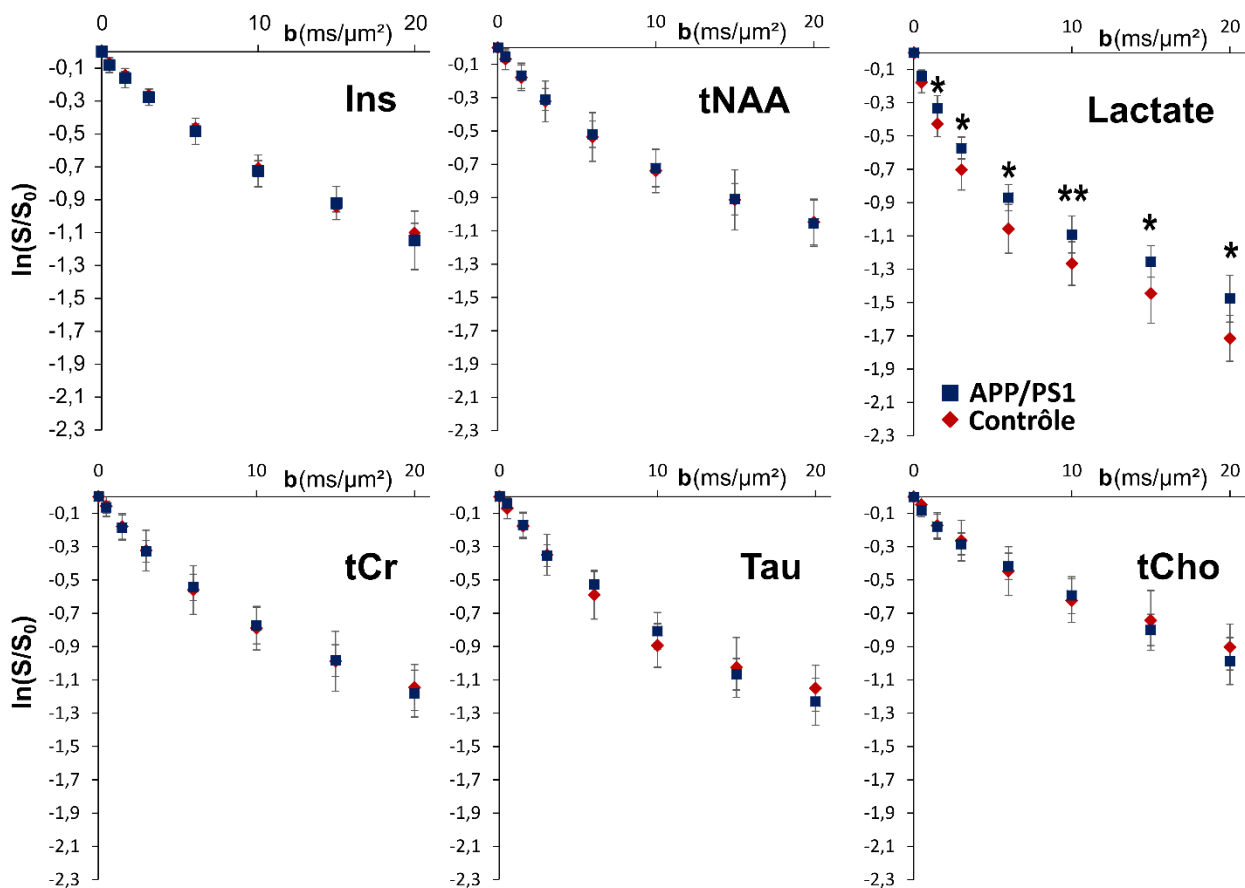
Similairement aux résultats présentés chapitre 8.4.1, les spectres pondérés en diffusion et moyennés par groupe sont présentés figure 8-10-A. On constate que même aux plus hautes valeurs de pondération en diffusion, le pic de lactate à 1,31 ppm reste clairement visible, et semble toujours diminuer de façon plus importante dans le groupe contrôle. Cependant, cette variation semble moins marquée que ce que l'on observait avec la SE-LASER PC à 12 mois. On peut également souligner l'excellent ajustement des macromolécules au niveau du pic de lactate, illustré par la figure 8-10-B, qui promet une quantification fiable.



**figure 8-10** : A. Spectres acquis avec la séquence SE-LASER LSB pour 8 valeurs de  $b$  allant de  $0,02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  à  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , dans le cortex de souris contrôle et APP/PS1 âgées de 15 à 18 mois. Les spectres ont été moyennés sur 5 animaux pour chaque groupe pour améliorer le SNR. B. Zoom autour du pic de lactate. Le spectre de macromolécules superposé aux spectres à plus haute valeur de  $b$  illustre l'excellent fit des macromolécules et du lactate.

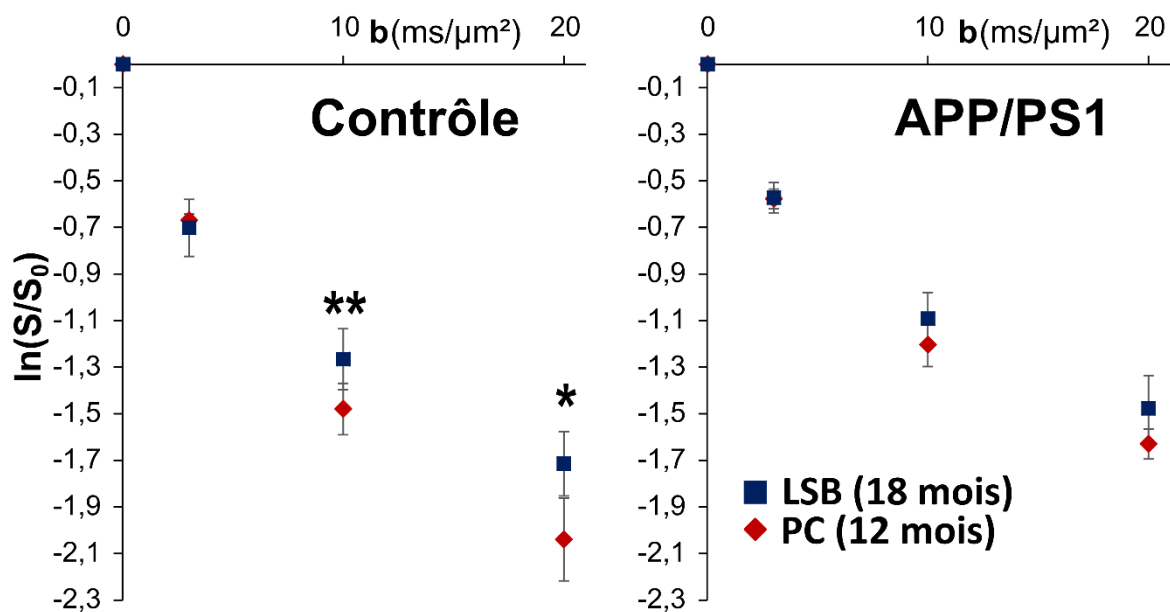
L'atténuation du signal des métabolites principaux a ensuite été tracée après quantification via LCModel et est visible figure 8-11. Pour les métabolites intracellulaires, on retrouve bien les résultats obtenus avec la séquence SE-LASER PC, avec des signaux très similaires entre les métabolites et entre les groupes. Il n'est donc toujours pas possible de différencier le milieu astrocytaire du milieu neuronal.

Le signal de diffusion du lactate, quant à lui, semble à première vue s'atténuer de la même façon que ce que l'on observait avec la séquence SE-LASER PC, avec un signal significativement moins atténué dans le groupe APP/PS1 comparé au groupe contrôle.



**figure 8-11** : Comparaison de l'atténuation du signal (moyenne sd sur 5 animaux) dans chaque groupe en fonction de  $b$  pour le myo-inositol, le tNAA, le lactate la créatine totale, la taurine, et la choline totale. L'atténuation du signal du lactate est significativement différente entre les deux groupes (t-test de Student, \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,05$ ).

On peut néanmoins remarquer que le signal moyenné du groupe contrôle ne semble pas s'atténuer de la même façon entre les deux séquences. En effet, comme le montre la figure 8-12, le signal moyenné du groupe contrôle est significativement moins atténué pour les mesures à 18 mois avec la séquence SE-LASER LSB. Cette tendance ne se retrouve pas dans le groupe APP/PS1, on peut donc émettre l'hypothèse que les souris contrôles subissent un déclin cognitif lié à l'âge, rendant la différence avec les APP/PS1 moindre, ce qui est cohérent avec la littérature (R. A. Harris et al., 2016).



**figure 8-12:** Comparaison de l'atténuation du signal du lactate avec la SE-LASER PC à 12 mois et la SE-LASER LSB à 18 mois. (t-test de Student, \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,05$ ).

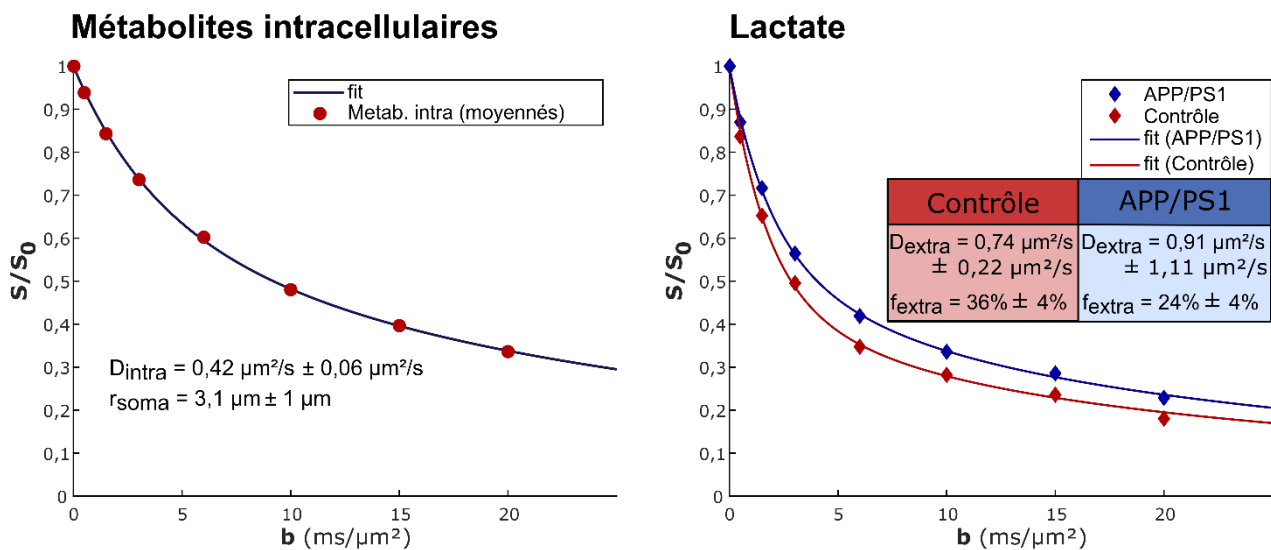
### 8.5.2. Modélisation des résultats

De la même façon que dans le paragraphe 8.4.2, nous avons modélisé les signaux des métabolites intracellulaires (tNAA, Ins, tCr, Tau, et tCho) en utilisant le modèle de sphères+cylindres et imposant le rayon des fibres à 0 (figure 8-13). Il en ressort une diffusivité intracellulaire moyenne et un rayon du corps cellulaire moyen proches de ce que l'on a pu obtenir à 12 mois avec la SE-LASER pc.

Le signal du lactate a ensuite été *fitté* de façon similaire pour chaque groupe à l'aide du même modèle à deux compartiments qui représente les espaces intra- et extra-cellulaires (figure 8-13, droite). On suppose toujours une diffusion gaussienne dans l'espace extracellulaire et on laisse la fraction extracellulaire  $f_{\text{extra}}$  et la diffusivité extracellulaire  $D_{\text{extra}}$  comme paramètres libres. On retrouve similairement aux résultats obtenus à 12 mois une diffusivité extracellulaire peu modifiée, et une baisse de fraction extracellulaire de lactate dans le groupe APP/PS1 d'environ 35%.

Il est ici intéressant de noter que, tout comme pour les résultats obtenus à 12 mois, l'erreur sur la diffusivité extracellulaire est très importante. Ceci peut s'expliquer assez simplement : puisque la diffusion dans l'espace extracellulaire est très rapide, nous ne pouvons l'estimer qu'aux petites valeurs de  $b$ . A plus haute valeur de  $b$ , le

signal extracellulaire à simplement disparu, donnant une information relativement précise sur la fraction de signal qui a disparu (d'où une faible déviation standard pour  $f_{\text{extra}}$ ), mais pas vraiment sur la « vitesse » à laquelle elle a disparu. On peut considérer que seuls les deux premiers points de mesure (à  $b=0,5$  et  $b=1,5$   $\text{ms}/\mu\text{m}^2$ ) apportent l'information nécessaire pour estimer  $D_{\text{extra}}$ , ce qui n'est pas suffisant pour obtenir une estimation robuste lorsque l'on ajoute du bruit par l'approche de Monte Carlo. Il est également important de rappeler ici que le modèle utilisé reste relativement simple comparé à la complexité de la structure cérébrale.

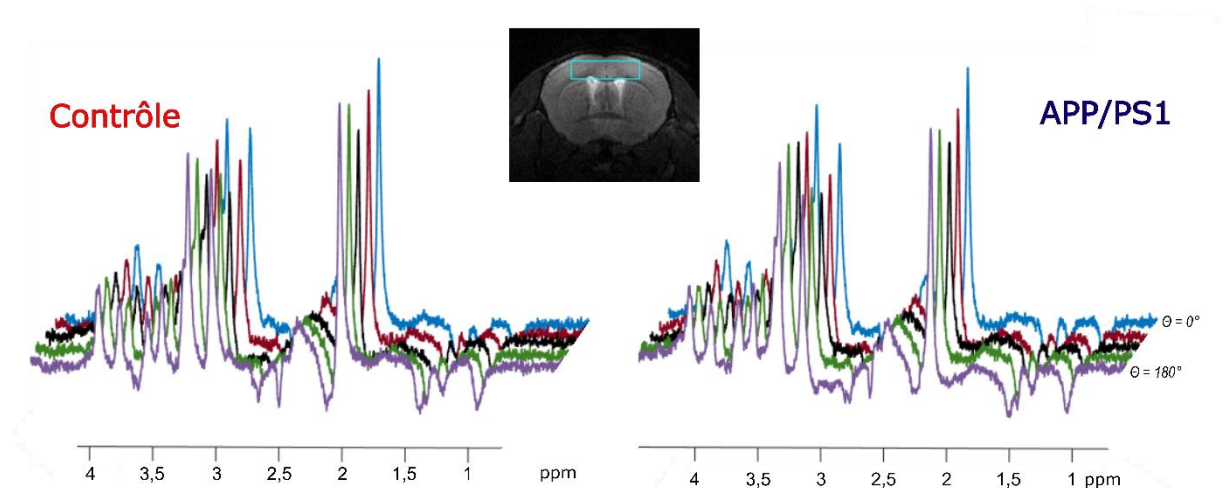


**figure 8-13** : fit de l'atténuation du signal moyenné pour les métabolites intracellulaires pour les deux groupes avec le modèle à deux compartiments sphères+cylindres (gauche) et de l'atténuation du signal du lactate pour chaque groupe (droite) en utilisant un modèle de deux compartiments sphères+cylindres (intra et extracellulaire) incluant les paramètres déterminés à gauche, et où  $f_{\text{extra}}$  et  $D_{\text{extra}}$  sont laissés libres. La déviation standard a été estimée à l'aide d'une approche de Monte Carlo ( $n=1000$  essais).  $D_{\text{extra}}$  reste relativement inchangé tandis que  $f_{\text{extra}}$  diminue d'environ 33 % chez les APP/PS1.

## 8.6. Mesures en DDE

Afin de compléter les résultats obtenus en hautes valeurs de  $b$ , nous avons scanné 4 animaux de chaque groupe, âgés de 12 mois environ, pour effectuer des mesures DDE. Ces mesures sont effectuées dans le même voxel cortical de 15  $\mu\text{L}$ , avec la séquence DDE-LASER décrite chapitre 5.2, pour une pondération totale de 15  $\text{ms}/\mu\text{m}^2$  ( $b = 7,5 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  sur chaque bloc).

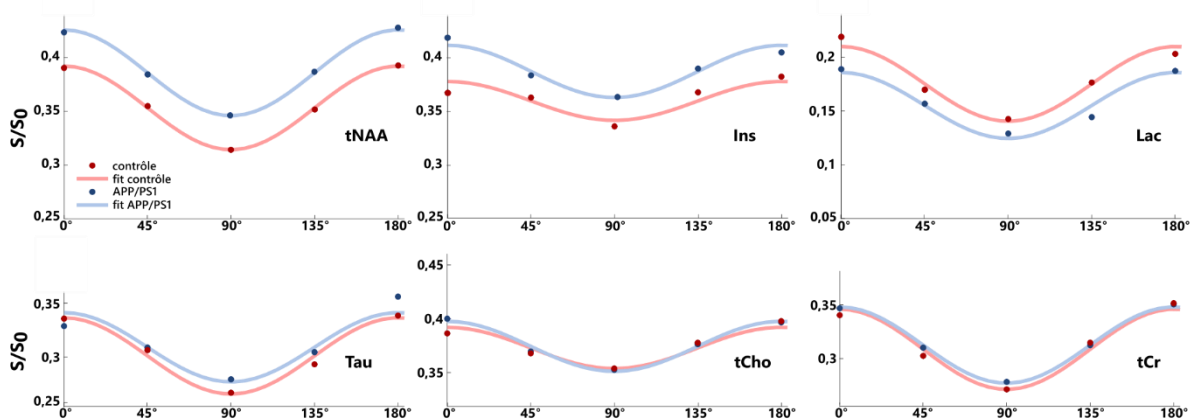
Individuellement, le rapport signal sur bruit de chaque spectre est trop faible pour permettre une quantification individuelle fiable. Nous avons donc pris la décision de sommer les spectres de chaque animal par groupe, et de quantifier cette somme. La figure 8-14 montre les spectres sommés pour chaque valeur d'angle.



**figure 8-14 :** Spectres acquis avec la séquence DDE-LASER pour 5 angles  $\theta$  allant de 0 à 180°, dans le cortex de souris contrôle et APP/PS1 âgées de 12 mois. Les spectres ont été moyennés sur 4 animaux pour chaque groupe pour améliorer le SNR. La modulation angulaire de l'amplitude du signal en fonction de  $\theta$  est clairement visible pour chaque groupe, notamment au niveau du pic du NAA à 2 ppm.

La modulation angulaire de l'amplitude du signal en fonction de  $\theta$  est appréciable pour les métabolites principaux. Le pic de lactate est également clairement visible pour  $\theta = 180^\circ$ . L'atténuation du signal a ensuite été quantifiée *via* LCModel pour le tNAA, le *myo*-inositol, le lactate, la taurine, la choline, et la créatine, puis *fittée* à la fonction  $A+B \cos(2\theta)$ . Les atténuations et *fits* correspondants sont visibles figure 8-15.

De prime abord, on constate que les signaux du tNAA et de l'inositol présentent une atténuation du signal moins prononcée dans le groupe APP/PS1 comparé au groupe contrôle. Cette tendance s'inverse dans le cas du lactate. Alors que l'amplitude de la modulation semble être similaire entre les deux groupes pour le tNAA, elle paraît moins prononcée dans le groupe APP/PS1 comparée au groupe contrôle dans le cas de l'inositol. Pour le lactate, elle paraît plus prononcée dans le groupe APP/PS1. Les autres métabolites ne semblent pas présenter de différence notable dans leur modulation de l'atténuation des signaux.



**figure 8-15** : modulation de l'atténuation du signal  $S/S_0$  des 6 métabolites d'intérêt pour les 2 groupes. Chaque point expérimental correspond au rapport l'intensité du signal à  $b=15 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  pour un  $\theta$  donné et de l'intensité du signal à  $b=0,04 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  et  $\theta=0^\circ$ . Le fit à la fonction  $A+B \cos(2\theta)$  est également affiché.

Les valeurs des coefficients A (atténuation du signal), B (amplitude de modulation) et le rapport B/A obtenu pour chaque métabolite après *fit* à la fonction  $A+B \cos(2\theta)$  est donné figure 8-16. On retrouve bien les variations observées sur la figure 8-15.

		Lac	Ins	tCho	tNAA	Tau	tCr	moyenne Intra
Offset (A)	Contrôle	0.1751	0.3594	0.3728	0.3519	0.2965	0.3087	0.3379
	APP/PS1	0.1550	0.3868	0.3743	0.3846	0.3045	0.3126	0.3526
Modulation d'amplitude (B)	Contrôle	0.0347	0.0181	0.0192	0.0389	0.0354	0.0373	0.0298
	APP/PS1	0.0307	0.0243	0.0232	0.0399	0.0322	0.0354	0.0310
rapport B/A	Contrôle	0.1984	0.0503	0.0514	0.1105	0.1195	0.1207	0.0881
	APP/PS1	0.1979	0.0629	0.0621	0.1037	0.1057	0.1133	0.0880

**figure 8-16** : coefficients A et B obtenus pour chaque métabolite après fit à  $A+B \cos(2\theta)$ , et rapport B/A correspondant. Le coefficient B est plus élevé pour les marqueurs gliaux (Ins et tCho) que pour les marqueurs neuronaux.

Commençons par comparer les métabolites du groupe contrôle entre eux : les métabolites gliaux, c'est-à-dire l'inositol et la choline, présentent une amplitude de modulation B plus faible que le tNAA, qui est un marqueur neuronal, bien que leur atténuation du signal (A) reste relativement similaire. Cela suggère une diffusion dans des compartiments à la géométrie différente. Il est ici intéressant de noter qu'avec la DDE-LASER, nous parvenons à différencier le compartiment neuronal du compartiment astrocytaire, ce qui n'était pas possible avec les mesures en SDE. Cette modélisation reste néanmoins très simpliste et insuffisante, et nécessite l'utilisation de modèles de cellules bien plus réalistes, avec corps cellulaires, fibres et embranchements. Ces



modèles sont actuellement en cours de développement par Maëli Jallais, post-doctorante à CUBRIC, Cardiff.

Le lactate présente lui une atténuation du signal presque deux fois plus faible que les métabolites intracellulaires, ce qui est cohérent avec une diffusion plus rapide liée à la taille de la molécule, mais également une contribution extracellulaire.

Pour le groupe APP/PS1, on constate que l'amplitude de modulation des métabolites gliaux est plus élevée que dans le groupe contrôle, suggérant une diffusion dans des compartiments moins restreints, ce qui peut être expliqué par une éventuelle réactivité astrocytaire, reportée dans la littérature (Kamphuis et al., 2012).

Cependant, lorsque que l'on compare l'atténuation et l'amplitude du signal du lactate entre les deux groupes, on retrouve des résultats contraires à ce qui avait été montré avec les mesures en SDE, à savoir un signal plus atténué et une augmentation de fraction de lactate extracellulaire dans le groupe APP/PS1. Ces résultats ne peuvent néanmoins pas être pris en compte en l'état pour deux raisons principales : tout d'abord, il est utile de rappeler que les spectres individuels étaient trop bruités pour être analysés, et nous avons été contraints de les sommer. Le fit a donc été réalisé sur cette somme, et nous n'avons aucune estimation de l'erreur type sur chaque point de mesure. Enfin, comme évoqué paragraphe 7.3.2, les macromolécules sont particulièrement mal estimées au détriment du pic de lactate, et, malgré un profil de macromolécules similaire entre les deux groupes, ne sont pas *fittées* de la même façon puisque le résidu du *fit* est différent entre les deux groupes. Il est donc nécessaire d'améliorer le traitement de ces données, et en particulier la robustesse du *fit* des macromolécules, avant de pouvoir analyser plus en détail et conclure sur ces résultats en DDE.

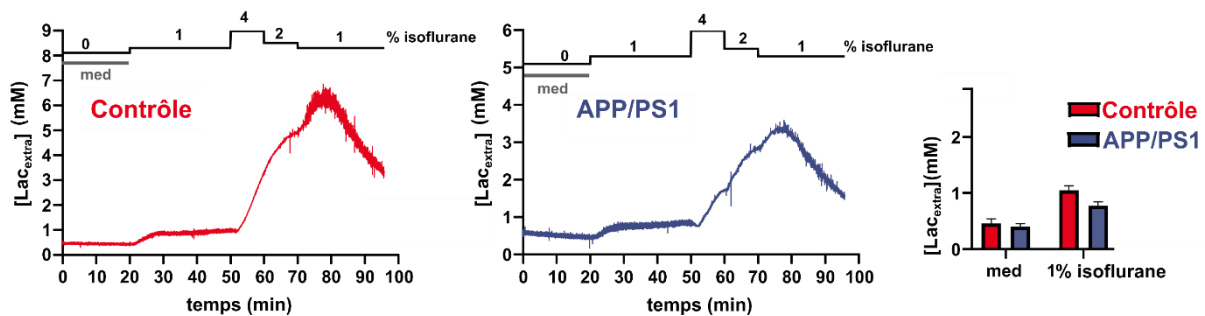
## 8.7. Mesures électro-optiques et chimiques de référence

Afin de confirmer et expliciter les variations obtenues par mesures de diffusion entre les souris APP/PS1 et les souris contrôle, des mesures de référence, présentées chapitre 6.2, sont effectuées. Les résultats présentés ci-dessous sont encore

préliminaires, puisque les derniers animaux n'ont pas encore été étudiés. Ces mesures ont toutes été réalisées par Rodrigo Lerchundi, post-doctorant dans l'équipe.

### 8.7.1. Micro-électrodes

Afin de mesurer la concentration de lactate dans le milieu extracellulaire, deux microélectrodes, une sensible au lactate, et une contrôle, ont été implantées par stéréotaxie dans le cortex de 3 souris APP/PS1 et 4 souris contrôle âgées de 12 à 15 mois. Les souris étaient d'abord anesthésiées sous médétomidine par perfusion sous-cutanée. Au bout de 20 minutes d'enregistrement, la perfusion est arrêtée pour passer à une anesthésie gazeuse, sous 1% d'isoflurane, qui correspond aux conditions d'anesthésie que nous employons à l'IRM. L'enregistrement se poursuit pendant 30 minutes supplémentaires. La concentration d'isoflurane est ensuite augmentée à 4% puis rediminuée à 2 puis 1%. Ces dernières étapes servent de contrôle. Les animaux sont ensuite sacrifiés sans réveil.



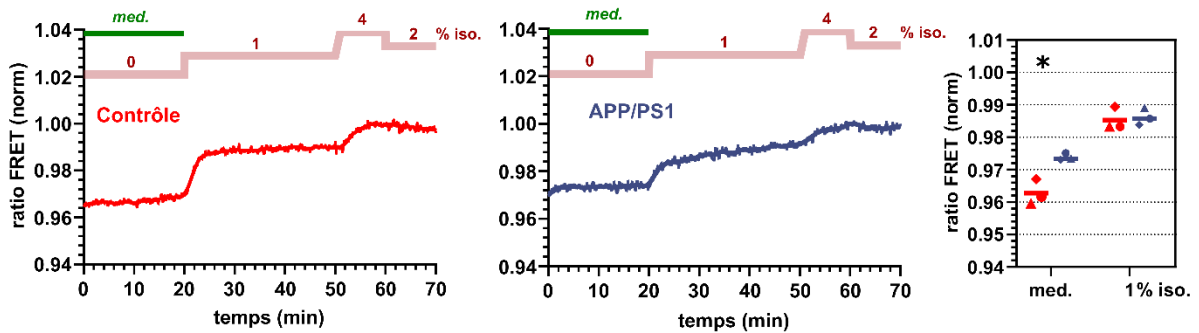
**figure 8-17 :** Concentrations de lactate extracellulaire dans le cortex de souris contrôle (rouge) et APP/PS1 (bleu) sous médétomidine puis 1% d'isoflurane ; mesurées par un biosenseur enzymatique. Résultats obtenus par Rodrigo Lerchundi. (t-test, 1% :  $p < 0,01$ )

Les résultats sont présentés figure 8-17. Pour 1% d'isoflurane, qui correspond aux conditions d'anesthésie pour les mesures de diffusion, on constate que la concentration de lactate extracellulaire est significativement plus faible chez le groupe APP/PS1 comparé au groupe témoin, d'environ 25%. Ces résultats sont donc cohérents avec les variations de fraction de lactate extracellulaire que l'on a extraites de la modélisation des signaux pondérés en diffusion, suggérant donc que la baisse de  $f_{extra}$  estimée en diffusion est liée à cette baisse de la concentration de lactate extracellulaire, plutôt qu'à une diminution du volume extracellulaire.

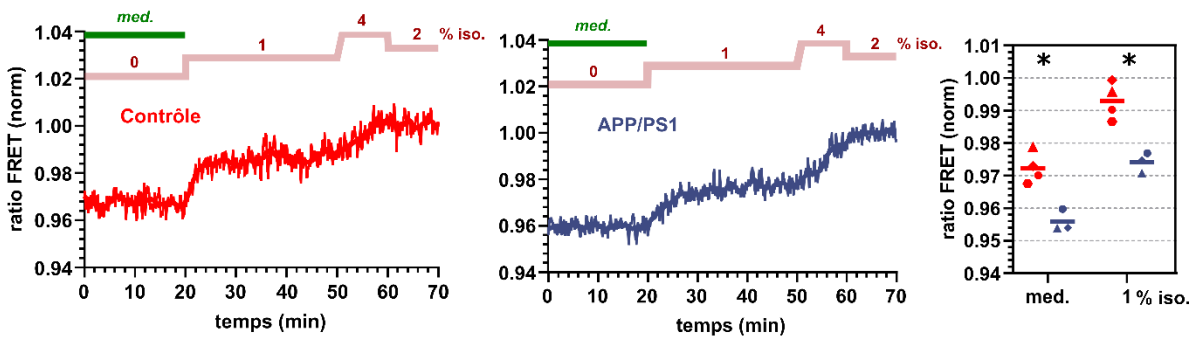
### 8.7.2. Fibre optique

Une fibre optique a été implantée dans le cortex de souris APP/PS1 et contrôle, âgées de 12 mois, suivie par l'injection d'AAV selon le protocole décrit chapitre 6.2, dans le but d'être sensibles à la concentration de lactate intracellulaire par photométrie FRET. Le protocole d'anesthésie est identique à celui utilisé pour les mesures électrochimiques, soit médétomidine - 1% isoflurane - 4% isoflurane - 2% d'isoflurane.

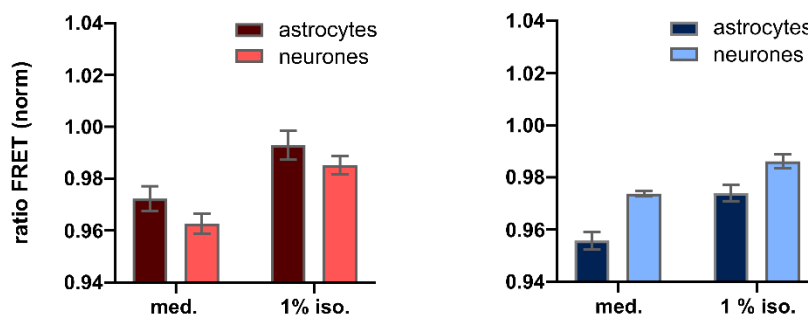
#### A. Neurones



#### B. Astrocytes



#### C.



**figure 8-18** : Concentrations relatives de lactate intracellulaire détectée par photométrie basée sur le FRET, dans A. les neurones, et B. les astrocytes, sous médétomidine, puis sous 1% d'isoflurane. Les ratios FRET sont normalisés par rapport aux plus hautes valeurs obtenues sous 4% d'isoflurane. Les courbes sont données à titre d'illustration pour un animal. C. Comparaison des ratios FRET obtenus entre neurones (clair) et astrocytes (foncé) chez les souris contrôle (rouge, à gauche) et APP/PS1 (bleu, à droite). (t-test : \* p < 0,5). Résultats obtenus par Rodrigo Lerchundi.

Dans les neurones, on constate une augmentation de la concentration de lactate dans le groupe APP/PS1 comparé au groupe témoin, mais uniquement sous médétomidine (figure 8-18-A). Sous 1% d'isoflurane, on n'observe aucune variation

significative. Néanmoins, dans le compartiment astrocytaire, la concentration de lactate est significativement plus élevée chez les souris APP/PS1 sous médétomidine, et cet écart semble augmenter lorsque l'on passe à 1% d'isoflurane (figure 8-18-B). Enfin, lorsque l'on compare les concentrations astrocytaires et neuronales par groupe, on constate que dans les deux conditions d'anesthésie, la concentration de lactate astrocytaire est plus élevée que la concentration de lactate neuronal dans le groupe contrôle (figure 8-18-C). Cependant, cette tendance semble s'inverser dans le groupe APP/PS1, avec une concentration de lactate astrocytaire plus faible que la concentration de lactate neuronal.

## 8.8. Discussion

Les résultats des méthodes invasives présentés ici montrent une diminution de concentration de lactate extracellulaire chez les souris APP/PS1 par rapport au groupe contrôle. Au niveau intracellulaire, dans le groupe contrôle, la concentration de lactate astrocytaire est plus élevée que la concentration de lactate neuronal, et cette tendance s'inverse chez les APP/PS1. Ces résultats suggèrent donc que le gradient de lactate des astrocytes aux neurones est altéré chez les souris APP/PS1 anesthésiées à l'isoflurane. La différence dans le niveau de lactate astrocytaire semble cohérent avec les études montrant une utilisation de glucose réduite dans les cas de réactivité astrocytaire (Escartin et al., 2007b).

Les mesures en spectroscopie de diffusion à hautes valeurs de  $b$  à 12 puis 18 mois n'ont pas permis de retrouver les différences de concentrations intracellulaires observées avec les mesures FRET, puisque, dans le voxel choisi, les signatures de diffusion des métabolites intra-neuronaux et intra-astrocytaires sont trop similaires pour pouvoir les distinguer. Cette absence de différenciation n'est pas commune à toutes les régions du cerveau. En effet, (Ligneul et al., 2019) montrent par exemple que dans le striatum de la souris et pour un temps de diffusion relativement similaire, les métabolites intra-neuronaux diffusent moins vite que les métabolites intra-astrocytaires (Ligneul et al., 2017b, 2019). Cependant, les résultats préliminaires obtenus en DDE sont encourageants puisqu'ils permettent de retrouver ces distinctions

entre les deux compartiments. Un travail plus approfondi de traitement des signaux est néanmoins nécessaire pour *fitter* au mieux les macromolécules et en extraire un signal de lactate robuste.

En revanche, en SDE, que ce soit à 12 ou 18 mois, la modélisation des résultats permet d'extraire une fraction volumique de lactate extracellulaire diminuée d'environ 35% chez les APP/PS1 par rapport au groupe contrôle, en accord avec la variation mesurée via microélectrodes implantées dans le cerveau.

Le modèle de sphères et cylindres utilisé ici est néanmoins relativement simpliste et ne permet pas d'extraire de façon fiable une diffusivité extracellulaire pour le lactate. Il serait possible d'obtenir davantage d'informations, et ce de façon plus robuste, en modélisant simultanément les résultats obtenus en DDE et en SDE, via un modèle plus complexe. Un tel travail est en cours de développement.

Ces travaux ont fait l'objet de communications orale au 6<sup>ème</sup> congrès de la SFRMBM ainsi que sous forme de poster digital lors du 31<sup>ème</sup> congrès annuel de l'ISMRM. Un article est en cours de préparation sur les données à hautes valeurs de  $b$ .

## Publications associées

SFRMBM 2021 : Communication orale

Malaquin, S., Mougel, E., Lerchundi, R., & Valette, J. **Etude des modifications de compartimentation du lactate cérébral par DW-MRS chez des souris APP/PS1.** SFRMBM 2023

ISMRM 2021 : Poster électronique

Malaquin, S., Mougel, E., Lerchundi, R., & Valette, J. **Investigating changes in brain lactate compartmentation using diffusion-weighted MRS in APP/PS1 mice.** Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 2023, 31, 4477.

## DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

---

La question de savoir si la spectroscopie de diffusion est sensible à la compartimentation du lactate cérébral par spectroscopie de diffusion nous a accompagnés tout au long de ce travail de thèse.

Le pic de lactate étant peu intense, superposé à des résonances de macromolécules et soumis au couplage  $J$ , les séquences RMN utilisées doivent être choisies avec soin pour maximiser l'intensité du signal. Dans le chapitre 4, nous avons détaillé les différentes séquences développées. Nous avons préféré une séquence d'écho de spin à la séquence d'écho stimulé habituellement utilisée au sein du laboratoire. Ce choix a permis de se placer dans un voxel bien plus petit qu'avec la STE-LASER, mais également plus homogène en terme de composition, tout en conservant le plus de signal possible. Nous avons développé une nouvelle impulsion « long single band » pour remplacer l'impulsion polychromatique aux bandes passantes très étroites qui lui conféraient un manque de stabilité au cours d'une même expérience.

Le choix de l'anesthésie a également été soumis à questionnement. L'isoflurane, utilisé en règle générale, influe sur la concentration de lactate. Cependant, la médétomidine aurait un effet inhibiteur sur la concentration de lactate. Toujours dans l'optique d'avoir un signal de lactate mesurable, nous avons fait le choix de conserver l'isoflurane, mais nous attirons ici l'attention du lecteur sur le fait qu'il est nécessaire, dans un souci de reproductibilité, de conserver la même concentration d'isoflurane au cours des mesures de diffusion et d'une expérience à l'autre. Idéalement, des expériences sur animaux éveillés et habitués aux examens IRM seraient idéales pour s'affranchir totalement des effets de l'anesthésie.

Le challenge principal des mesures de diffusion du lactate réside finalement dans la complexité de *fit* convenablement le lactate, dont la résonance à 1,31 ppm se superpose à celle des macromolécules et la faible intensité du pic, particulièrement aux valeurs de  $b$  les plus élevées, ne rend pas la tâche plus aisée. Nous évoquons d'ailleurs ce problème dans le chapitre 7, où nous avons constaté que le modèle d'activation astrocytaire par transfert du gène CNTF développait des masses tumorales autour du site d'injection et ce plusieurs mois après l'injection. Les tumeurs étaient associées à des gouttelettes lipidiques résonant à 1,3 ppm, que l'on pouvait aisément confondre sur le spectre métabolique avec le lactate, et il était difficile de déterminer la contribution au spectre de chacun de ces deux pics. Dès lors, la quantification fiable

du lactate devient fortement compromise. Ces données ne remettent pas en cause les résultats de l'étude menée par Ligneul et al. en 2019 au laboratoire concernant les métabolites intracellulaires : le profil de diffusion du myo-inositol reflète très bien une hypertrophie des astrocytes. Nos résultats concernant la choline et créatine totales vont en faveur de cette théorie, et témoignent d'une meilleure sensibilité, que l'on peut expliquer par la plus petite taille mais la meilleure l'homogénéité du voxel dans lequel nous nous sommes placés.

Bien qu'à l'heure actuelle, il soit encore difficile de déterminer de façon absolue la répartition du lactate dans les différents compartiments cérébraux, nous avons montré qu'il est néanmoins possible, avec une précision relative, d'estimer la proportion de lactate intra et extra-cellulaire, et de comparer ces distributions chez un modèle pathologique. En effet, avec le chapitre 8, nous avons appliqué ces techniques au modèle murin APP/PS1 de la maladie d'Alzheimer, et nous présentons des résultats prometteurs dans ce sens. Les mesures à hautes valeurs de pondération en diffusion ne nous ont pas permis de distinguer les compartiments intracellulaires les uns des autres, mais nous avons pu observer un signal de diffusion du lactate nettement moins atténué dans le groupe APP/PS1, qui témoigne d'une modification de compartimentation du métabolite entre les deux groupes. Le chapitre 6 présentait les modèles à notre disposition pour modéliser ces résultats : même si nous n'avons pas suffisamment de points de mesures pour établir une valeur de diffusivité extracellulaire réaliste, nous avons néanmoins pu estimer une diminution de fraction extracellulaire dans le groupe APP/PS1. Cette diminution a par la suite été confirmée par des mesures de concentration absolue de lactate dans l'espace extracellulaire à l'aide de microélectrodes. Les mesures en DDE, en raison de leur faible SNR et d'une mauvaise estimation de la contribution du lactate aux spectres, sont encore peu fiables, mais les analyses préliminaires laissent espérer une sensibilité accrue à l'espace intracellulaire, puisque nous semblons capables de détecter des variations de l'amplitude de la modulation angulaire entre métabolites et ainsi distinguer le compartiment astrocytaire du compartiment neuronal. L'ajustement de la base des macromolécules aux spectres des métabolites par LCModel n'est pas satisfaisant pour les mesures en DDE, et la quantification du lactate n'est pas fiable.

Puisque la DDE apporte des informations complémentaires aux données acquises à hautes valeurs de  $b$ , il serait désormais intéressant de modéliser les résultats des deux mesures de façon simultanée, une fois le traitement des données DDE amélioré, afin d'aboutir à une meilleure précision sur les valeurs des paramètres



microstructuraux estimés. Ce travail est actuellement en cours de développement par Maëliiss Jallais, post-doctorante sous la supervision de Marco Palombo au Brain Research Imaging Center à l'université de Cardiff. Les premiers résultats en ce sens sont très encourageants.

La modélisation effectuée sur les données acquises à hautes valeurs de  $b$  nous donne une fraction volumique de lactate extracellulaire relative, tandis que nous sommes en mesure, ou presque, de déterminer la concentration absolue de lactate dans chaque compartiment à l'aide des mesures électro-optiques de référence présentées chapitre 6 (FRET et microélectrodes). Sans estimation de fraction volumique occupée par l'espace extracellulaire, il sera difficile, à partir de  $f_{\text{extra}}$ , de retrouver la concentration absolue de lactate dans les compartiments intra et extra-cellulaires et la comparer aux concentrations mesurées invasivement. Il semblerait alors, pour le lactate, que nous ayons atteint les limites de ce que la spectroscopie de diffusion peut mesurer.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Alexander, D. C., Dyrby, T. B., Nilsson, M., & Zhang, H. (2019). Imaging brain microstructure with diffusion MRI: Practicality and applications. *NMR in Biomedicine*, 32(4), e3841. <https://doi.org/10.1002/nbm.3841>
- Ames, A. (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Research Reviews*, 34(1), 42-68. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00038-2)
- Ariyannur, P. S., Madhavarao, C. N., & Namboodiri, A. M. A. (2008). N-acetylaspartate synthesis in the brain: Mitochondria vs. microsomes. *Brain Research*, 1227, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.040>
- Ashrafian, H., Zadeh, E. H., & Khan, R. H. (2021). Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 382-394. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.192>
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 641-653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>
- Bak, L. K., & Walls, A. B. (2018). CrossTalk opposing view: Lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *The Journal of Physiology*, 596(3), 351-353. <https://doi.org/10.1113/JP274945>
- Balança, B., Meiller, A., Bezin, L., Dreier, J. P., Marinesco, S., & Lieutaud, T. (2017). Altered hypermetabolic response to cortical spreading depolarizations after traumatic brain injury in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(5), 1670-1686. <https://doi.org/10.1177/0271678X16657571>
- Barros, L. F., & Weber, B. (2018). Rebuttal from L. F. Barros and B. Weber. *The Journal of Physiology*, 596(3), 355-356. <https://doi.org/10.1113/JP275506>

- Belle, J. E. L., Harris, N. G., Williams, S. R., & Bhakoo, K. K. (2002). A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, *15*(1), 37-44. <https://doi.org/10.1002/nbm.740>
- Benigni, F., Villa, P., Demitri, M. T., Sacco, S., Sipe, J. D., Lagunowich, L., Panayotatos, N., & Ghezzi, P. (1995). Ciliary neurotrophic factor inhibits brain and peripheral tumor necrosis factor production and, when coadministered with its soluble receptor, protects mice from lipopolysaccharide toxicity. *Molecular Medicine*, *1*(5), 568-575.
- Bloch, F. (1946). *Nuclear Induction*. *70*(7), 460-474.
- Boretius, S., Tammer, R., Michaelis, T., Brockmöller, J., & Frahm, J. (2013). Halogenated volatile anesthetics alter brain metabolism as revealed by proton magnetic resonance spectroscopy of mice in vivo. *NeuroImage*, *69*, 244-255. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.12.020>
- Boumezbeur, F., Petersen, K. F., Cline, G. W., Mason, G. F., Behar, K. L., Shulman, G. I., & Rothman, D. L. (2010). The Contribution of Blood Lactate to Brain Energy Metabolism in Humans Measured by Dynamic <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *The Journal of Neuroscience*, *30*(42), 13983-13991. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2040-10.2010>
- Bouzier-Sore, A.-K., Serres, S., Canioni, P., & Merle, M. (2003). Lactate involvement in neuron–glia metabolic interaction: <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy contribution. *Biochimie*, *85*(9), 841-848. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.08.003>
- Brand, A., Richter-Landsberg, C., & Leibfritz, D. (1993). Multinuclear NMR Studies on the Energy Metabolism of Glial and Neuronal Cells. *Developmental Neuroscience*, *15*(3-5), 289-298. <https://doi.org/10.1159/000111347>
- Brennan, B. P., Hudson, J. I., Jensen, J. E., McCarthy, J., Roberts, J. L., Prescott, A. P., Cohen, B. M., Pope, H. G., Renshaw, P. F., & Ongür, D. (2010). Rapid enhancement of glutamatergic neurotransmission in bipolar depression following treatment with riluzole. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *35*(3), 834-846. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.191>

- Brown, R. (1828). *A Brief Account of Microscopical Observations Made in the Months of June, July, and August, 1827, on the Particles Contained in the Pollen of Plants; and on the General Existence of Active Molecules in Organic and Inorganic Bodies*. Richard Taylor.
- Buonocore, M. H., & Maddock, R. J. (2015). Magnetic resonance spectroscopy of the brain: A review of physical principles and technical methods. *Reviews in the Neurosciences*, 26(6), 609-632. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0010>
- Burcaw, L. M., Fieremans, E., & Novikov, D. S. (2015). Mesoscopic structure of neuronal tracts from time-dependent diffusion. *NeuroImage*, 114, 18-37. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.03.061>
- Cady, E. B., D'Souza, P. C., Penrice, J., & Lorek, A. (1995). The Estimation of Local Brain Temperature by in Vivo <sup>1</sup>H Magnetic Resonance Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 33(6), 862-867. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910330620>
- Callaghan, P. T. (1995). Pulsed-Gradient Spin-Echo NMR for Planar, Cylindrical, and Spherical Pores under Conditions of Wall Relaxation. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 113(1), 53-59. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1055>
- Callaghan, P. T., Eccles, C. D., & Xia, Y. (1988). NMR microscopy of dynamic displacements: K-space and q-space imaging. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 21(8), 820. <https://doi.org/10.1088/0022-3735/21/8/017>
- Callaghan, P. T., & Xia, Y. (1991). Velocity and diffusion imaging in dynamic NMR microscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 91(2), 326-352. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(91\)90196-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2364(91)90196-Z)
- Carruthers-Jones, D. I., & van Gelder, N. M. (1978). Influence of taurine dosage on cobalt epilepsy in mice. *Neurochemical Research*, 3(1), 115-123. <https://doi.org/10.1007/BF00964364>
- Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., & Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 25(2), 77-95. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>

- Chatard, C., Meiller, A., & Marinesco, S. (2018). Microelectrode Biosensors for in vivo Analysis of Brain Interstitial Fluid. *Electroanalysis*, 30(6), 977-998. <https://doi.org/10.1002/elan.201700836>
- Cheng, Y., & Cory, D. G. (1999). Multiple Scattering by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 121(34), 7935-7936. <https://doi.org/10.1021/ja9843324>
- Chklovskii, D. B., Schikorski, T., & Stevens, C. F. (2002). Wiring Optimization in Cortical Circuits. *Neuron*, 34(3), 341-347. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00679-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00679-7)
- Choi, J.-K., Dedeoglu, A., & Jenkins, B. G. (2007). Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR in Biomedicine*, 20(3), 216-237. <https://doi.org/10.1002/nbm.1145>
- Cohen, Y., & Assaf, Y. (2002). High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRS and MRI in neuronal tissues – a technical review. *NMR in Biomedicine*, 15(7-8), 516-542. <https://doi.org/10.1002/nbm.778>
- Connolly, N. P., Galisteo, R., Xu, S., Bar, E. E., Peng, S., Tran, N. L., Ames, H. M., Kim, A. J., Woodworth, G. F., & Winkles, J. A. (2021). Elevated fibroblast growth factor-inducible 14 expression transforms proneural-like gliomas into more aggressive and lethal brain cancer. *Glia*, 69(9), 2199-2214. <https://doi.org/10.1002/glia.24018>
- Corbett, R. J. T., Laptook, A. R., Tollefsbol, G., & Kim, B. (1995). Validation of a Noninvasive Method to Measure Brain Temperature In Vivo Using <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Journal of Neurochemistry*, 64(3), 1224-1230. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64031224.x>
- Craveiro, M., Clément-Schatlo, V., Marino, D., Gruetter, R., & Cudalbu, C. (2014). In vivo brain macromolecule signals in healthy and glioblastoma mouse models: <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy, post-processing and metabolite quantification at 14.1 T. *Journal of Neurochemistry*, 129(5), 806-815. <https://doi.org/10.1111/jnc.12673>
- Cudalbu, C., Behar, K. L., Bhattacharyya, P. K., Bogner, W., Borbath, T., de Graaf, R. A., Gruetter, R., Henning, A., Juchem, C., Kreis, R., Lee, P., Lei, H., Marjańska, M., Mektele, R., Murali-Manohar, S., Považan, M., Rackayová, V., Simicic, D., Slotboom, J., ...

- Mlynárik, V. (2021). Contribution of macromolecules to brain <sup>1</sup>H MR spectra: Experts' consensus recommendations. *NMR in Biomedicine*, 34(5), e4393. <https://doi.org/10.1002/nbm.4393>
- de Almeida, L. P., Zala, D., Aebischer, P., & Déglon, N. (2001). Neuroprotective Effect of a CNTF-Expressing Lentiviral Vector in the Quinolinic Acid Rat Model of Huntington's Disease. *Neurobiology of Disease*, 8(3), 433-446. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0388>
- de Graaf, R. A. (2007). *In vivo NMR spectroscopy, Principles and Techniques* (Second edition). John Wiley & Sons.
- de Graaf, R. A., Brown, P. B., McIntyre, S., Nixon, T. W., Behar, K. L., & Rothman, D. L. (2006). High magnetic field water and metabolite proton T1 and T2 relaxation in rat brain in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine*, 56(2), 386-394. <https://doi.org/10.1002/mrm.20946>
- de Graaf, R. A., Rothman, D. L., & Behar, K. L. (2011). State of the art direct <sup>13</sup>C and indirect <sup>1</sup>H-[<sup>13</sup>C] NMR spectroscopy in vivo. A practical guide. *NMR in Biomedicine*, 24(8), 958-972. <https://doi.org/10.1002/nbm.1761>
- Duarte, J. M. N., Do, K. Q., & Gruetter, R. (2014). Longitudinal neurochemical modifications in the aging mouse brain measured in vivo by <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1660-1668. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.135>
- Einstein, A. (1905). *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*. 17, 549-560.
- Eisenberg, F., & Parthasarathy, R. (1987). Measurement of biosynthesis of myo-inositol from glucose 6-phosphate. In *Methods in Enzymology* (Vol. 141, p. 127-143). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)41061-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)41061-6)
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature,

- definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Escartin, C., Pierre, K., Colin, A., Brouillet, E., Delzescaux, T., Guillermier, M., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Pellerin, L., & Bonvento, G. (2007a). Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults. *The Journal of Neuroscience*, 27(27), 7094-7104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-07.2007>
- Escartin, C., Pierre, K., Colin, A., Brouillet, E., Delzescaux, T., Guillermier, M., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Pellerin, L., & Bonvento, G. (2007b). Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults. *Journal of Neuroscience*, 27(27), 7094-7104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-07.2007>
- Fisher, S. K., Novak, J. E., & Agranoff, B. W. (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: Homeostasis, metabolism and functional significance. *Journal of Neurochemistry*, 82(4), 736-754. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01041.x>
- Foster, M., Sherrington, C. S., & University College, L. L. S. (1897). *A textbook of physiology. With C.S. Sherrington. Part 3. The central nervous system [electronic resource]*. London: Macmillan. <http://archive.org/details/b21271458>
- Fox, L. M., & Yamamoto, A. (2015). Chapter 7—Macroautophagy of Aggregation-Prone Proteins in Neurodegenerative Disease. In M. A. Hayat (Éd.), *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* (p. 117-137). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801043-3.00007-8>
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell\*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12845-12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., & Frosch, M. P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of

- Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease*, 24(3), 516-524. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.017>
- Garwood, M., & DelaBarre, L. (2001). The Return of the Frequency Sweep: Designing Adiabatic Pulses for Contemporary NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 153(2), 155-177. <https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2340>
- Gjedde, A., & Magistretti, P. J. (2011). Cellular mechanisms of brain energy metabolism. In *Neurological Surgery* (6th éd.). Youmans and Winn.
- Goudet, C., Magnaghi, V., Landry, M., Nagy, F., Gereau, R. W., & Pin, J.-P. (2009). Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Research Reviews*, 60(1), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.007>
- Graeber, M. B., & Stre'rt, W. J. (1990). Microglia: Immune Network in the CNS. *Brain Pathology*, 1(1), 2-5. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1990.tb00630.x>
- Griffin, J. L., Bollard, M., Nicholson, J. K., & Bhakoo, K. (2002). Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS 1H NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 15(6), 375-384. <https://doi.org/10.1002/nbm.792>
- Haase, A., Frahm, J., Hanicke, W., & Matthaei, D. (1985). 1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in Medicine & Biology*, 30(4), 341. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/30/4/008>
- Harris, J. J., Jolivet, R., & Attwell, D. (2012). Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron*, 75(5), 762-777. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>
- Harris, R. A., Tindale, L., Lone, A., Singh, O., Macauley, S. L., Stanley, M., Holtzman, D. M., Bartha, R., & Cumming, R. C. (2016). Aerobic Glycolysis in the Frontal Cortex Correlates with Memory Performance in Wild-Type Mice But Not the APP/PS1 Mouse Model of Cerebral Amyloidosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(6), 1871-1878. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3131-15.2016>
- Hayashi, T. (1959). The inhibitory action of  $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -aminobutyric acid upon the seizure following stimulation of the motor cortex of the dog. *The Journal of*



*Physiology*, 145(3), 570-578.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377-1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>

Hernández-Benítez, R., Pasantes-Morales, H., Saldaña, I. T., & Ramos-Mandujano, G. (2010). Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *Journal of Neuroscience Research*, 88(8), 1673-1681. <https://doi.org/10.1002/jnr.22328>

Hertz, L. (2008). Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacology*, 55(3), 289-309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.023>

Hindman, J. C. (1966). Proton Resonance Shift of Water in the Gas and Liquid States. *The Journal of Chemical Physics*, 44(12), 4582-4592. <https://doi.org/10.1063/1.1726676>

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6286), 712-716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>

Horn, T., & Klein, J. (2010). Lactate levels in the brain are elevated upon exposure to volatile anesthetics: A microdialysis study. *Neurochemistry International*, 57(8), 940-947. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.09.014>

Hung, A. S. M., Liang, Y., Chow, T. C. H., Tang, H. C., Wu, S. L. Y., Wai, M. S. M., & Yew, D. T. (2016). Mutated tau, amyloid and neuroinflammation in Alzheimer disease—A brief review. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.01.001>

Hyder, F., Rothman, D. L., & Bennett, M. R. (2013). Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 110(9), 3549-3554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214912110>
- Ianuș, A., Jespersen, S. N., Serradas Duarte, T., Alexander, D. C., Drobnjak, I., & Shemesh, N. (2018). Accurate estimation of microscopic diffusion anisotropy and its time dependence in the mouse brain. *NeuroImage*, 183, 934-949. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.08.034>
- Isaacks, R. E., Bender, A. S., Kim, C. Y., Prieto, N. M., & Norenberg, M. D. (1994). Osmotic regulation of myo-inositol uptake in primary astrocyte cultures. *Neurochemical Research*, 19(3), 331-338. <https://doi.org/10.1007/BF00971582>
- Izumi, K., Donaldson, J., Minnich, J. L., & Barbeau, A. (1973). Ouabain-Induced Seizures in Rats: Suppressive Effects of Taurine and  $\gamma$ -Aminobutyric acid. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(12), 885-889. <https://doi.org/10.1139/y73-136>
- Jackson, H. M., Soto, I., Graham, L. C., Carter, G. W., & Howell, G. R. (2013). Clustering of transcriptional profiles identifies changes to insulin signaling as an early event in a mouse model of Alzheimer's disease. *BMC Genomics*, 14, 831. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-831>
- Jagannathan, N. R., Desai, N. G., & Raghunathan, P. (1996). Brain metabolite changes in alcoholism: An in vivo proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) study. *Magnetic Resonance Imaging*, 14(5), 553-557. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(96\)00048-3](https://doi.org/10.1016/0730-725X(96)00048-3)
- Jenkins, B. G., Klivenyi, P., Kustermann, E., Andreassen, O. A., Ferrante, R. J., Rosen, B. R., & Beal, M. F. (2000). Nonlinear Decrease over Time in N-Acetyl Aspartate Levels in the Absence of Neuronal Loss and Increases in Glutamine and Glucose in Transgenic Huntington's Disease Mice. *Journal of Neurochemistry*, 74(5), 2108-2119. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742108.x>
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., & Hol, E. M. (2012). Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, 60(4), 615-629. <https://doi.org/10.1002/glia.22295>
- Kanda, T., & Hikasa, Y. (2008). Effects of medetomidine and midazolam alone or in

combination on the metabolic and neurohormonal responses in healthy cats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(4), 332-339.

Karagiannis, A., Sylantyev, S., Hadjihambi, A., Hosford, P. S., Kasparov, S., & Gourine, A. V. (2016). Hemichannel-mediated release of lactate. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(7), 1202-1211. <https://doi.org/10.1177/0271678X15611912>

Karran, E., Mercken, M., & Strooper, B. D. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>

King, M. D., Houseman, J., Roussel, S. A., Van Bruggen, N., Williams, S. R., & Gadian, D. G. (1994). Q-Space imaging of the brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 32(6), 707-713. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910320605>

Krigman, M. R., & Hogan, E. L. (1976). Undernutrition in the developing rat: Effect upon myelination. *Brain Research*, 107(2), 239-255. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90224-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90224-9)

Kuchel, P. W., Coy, A., & Stilbs, P. (1997). NMR « diffusion-diffraction » of water revealing alignment of erythrocytes in a magnetic field and their dimensions and membrane transport characteristics. *Magnetic Resonance in Medicine*, 37(5), 637-643. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910370502>

Kulak, A., Duarte, J. M. N., Do, K. Q., & Gruetter, R. (2010). Neurochemical profile of the developing mouse cortex determined by in vivo 1H NMR spectroscopy at 14.1 T and the effect of recurrent anaesthesia. *Journal of Neurochemistry*, 115(6), 1466-1477. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07051.x>

Lahrech, H., Zoula, S., Farion, R., Rémy, C., & Décorps, M. (2001). In vivo measurement of the size of lipid droplets in an intracerebral glioma in the rat. *Magnetic Resonance in Medicine*, 45(3), 409-414. [https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200103\)45:3<409::AID-MRM1053>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200103)45:3<409::AID-MRM1053>3.0.CO;2-O)

Lambers, H., Wachsmuth, L., Thomas, D., Boumezbeur, F., Hoesker, V., Pradier, B., &

- Faber, C. (2022). Fiber-based lactate recordings with fluorescence resonance energy transfer sensors by applying an magnetic resonance-informed correction of hemodynamic artifacts. *Neurophotonics*, 9(3), 032212. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.9.3.032212>
- Larrabee, M. G. (1996). Partitioning of CO<sub>2</sub> Production Between Glucose and Lactate in Excised Sympathetic Ganglia, with Implications for Brain. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1726-1734. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67041726.x>
- Lawrance, G., Rylett, R. J., Richardson, P. M., Dunn, R. J., Dow, K. E., & Riopelle, R. J. (1995). Differentiation Effects of Ciliary Neurotrophic Factor on Human Neuroblastoma Cells. *Journal of Neurochemistry*, 64(4), 1483-1490. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64041483.x>
- Le Roux, P. (2006). *Suites régulières d'impulsions Radio-fréquence en résonance magnétique. Applications à l'IRM*. Paris-Sud XI.
- Levitt, M. H. (2008). *Spin dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance* (2nd ed). John Wiley & Sons.
- Ligneul, C., Palombo, M., Hernández-Garzón, E., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Flament, J., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., Escartin, C., & Valette, J. (2019). Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo. *NeuroImage*, 191, 457-469. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.02.046>
- Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2017a). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(4), 1390-1398. <https://doi.org/10.1002/mrm.26217>
- Ligneul, C., Palombo, M., & Valette, J. (2017b). Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(4), 1390-1398. <https://doi.org/10.1002/mrm.26217>

- Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Probing metabolite diffusion at ultra-short time scales in the mouse brain using optimized oscillating gradients and « short »-echo-time diffusion-weighted MRS. *NMR in Biomedicine*, 30(1). <https://doi.org/10.1002/nbm.3671>
- Lilja, A., Nordborg, C., Brun, A., Salford, L. G., & Aman, P. (2001). Expression of the IL-6 family cytokines in human brain tumors. *International Journal of Oncology*, 19(3), 495-499. <https://doi.org/10.3892/ijo.19.3.495>
- Linse, P., & Soderman, O. (1995). The Validity of the Short-Gradient-Pulse Approximation in NMR Studies of Restricted Diffusion. Simulations of Molecules Diffusing between Planes, in Cylinders and Spheres. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 116(1), 77-86. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1192>
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., ... Murray, C. J. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2095-2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Mächler, P., Wyss, M. T., Elsayed, M., Stobart, J., Gutierrez, R., von Faber-Castell, A., Kaelin, V., Zuend, M., San Martín, A., Romero-Gómez, I., Baeza-Lehnert, F., Lengacher, S., Schneider, B. L., Aebischer, P., Magistretti, P. J., Barros, L. F., & Weber, B. (2016). In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism*, 23(1), 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.010>
- Magistretti, P. J. (2014). Synaptic Plasticity and the Warburg Effect. *Cell Metabolism*, 19(1), 4-5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.012>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>

- Malm, T. M., Iivonen, H., Goldsteins, G., Keksa-Goldsteine, V., Ahtoniemi, T., Kanninen, K., Salminen, A., Auriola, S., Van Groen, T., Tanila, H., & Koistinaho, J. (2007). Pyrrolidine dithiocarbamate activates Akt and improves spatial learning in APP/PS1 mice without affecting beta-amyloid burden. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(14), 3712-3721. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0059-07.2007>
- Marchadour, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Lebon, V., & Valette, J. (2012). Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(12), 2153-2160. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.119>
- Marjańska, M., & Terpstra, M. (2021). Influence of fitting approaches in LCModel on MRS quantification focusing on age-specific macromolecules and the spline baseline. *NMR in Biomedicine*, 34(5), e4197. <https://doi.org/10.1002/nbm.4197>
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K. P., & Norenberg, M. D. (1977). Glutamine Synthetase: Glial Localization in Brain. *Science*, 195(4284), 1356-1358. <https://doi.org/10.1126/science.14400>
- Mason, G. F., & Krystal, J. H. (2006). MR spectroscopy: Its potential role for drug development for the treatment of psychiatric diseases. *NMR in Biomedicine*, 19(6), 690-701. <https://doi.org/10.1002/nbm.1080>
- McIlwain, H. (1953). SUBSTANCES WHICH SUPPORT RESPIRATION AND METABOLIC RESPONSE TO ELECTRICAL IMPULSES IN HUMAN CEREBRAL TISSUES. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 16(4), 257-266.
- Meazza, C., Di Marco, A., Fruscella, P., Gloaguen, I., Laufer, R., Sironi, M., Sipe, J. D., Villa, P., Romano, M., & Ghezzi, P. (1997). Centrally Mediated Inhibition of Local Inflammation by Ciliary Neurotrophic Factor. *Neuroimmunomodulation*, 4(5-6), 271-276. <https://doi.org/10.1159/000097347>
- Meyerhoff, C., Bischof, F., Mennel, F. J., Sternberg, F., Bican, J., & Pfeiffer, E. F. (1993). On line continuous monitoring of blood lactate in men by a wearable device based upon an enzymatic amperometric lactate sensor. *Biosensors and Bioelectronics*,

8(9), 409-414. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(93\)80025-K](https://doi.org/10.1016/0956-5663(93)80025-K)

Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H., Leguit, N., Glennon, J., Koistinaho, J., Banerjee, P., & Tanila, H. (2008). Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 584-594. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x>

Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fülöp, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkänen, A., & Tanila, H. (2009). Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(11), 3453-3462. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009>

Mitra, P. P. (1995). Multiple wave-vector extensions of the NMR pulsed-field-gradient spin-echo diffusion measurement. *Physical Review B*, 51(21), 15074-15078. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.51.15074>

Moffett, J. R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C. N., & Namboodiri, A. M. A. (2007). N-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Progress in Neurobiology*, 81(2), 89-131. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.12.003>

Mougel, E., Malaquin, S., Vincent, M., & Valette, J. (2022). Using spectrally-selective radiofrequency pulses to enhance lactate signal for diffusion-weighted MRS measurements in vivo. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, 334, 107113. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2021.107113>

Muller, N., & Reiter, R. C. (1965). Temperature Dependence of Chemical Shifts of Protons in Hydrogen Bonds. *The Journal of Chemical Physics*, 42(9), 3265-3269. <https://doi.org/10.1063/1.1696408>

Najac, C., Branzoli, F., Ronen, I., & Valette, J. (2016). Brain intracellular metabolites are freely diffusing along cell fibers in grey and white matter, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. *Brain Structure & Function*, 221(3), 1245-1254. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0968-5>

- Newington, J. T., Harris, R. A., & Cumming, R. C. (2013). Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2013, 234572. <https://doi.org/10.1155/2013/234572>
- Newman, L. A., Korol, D. L., & Gold, P. E. (2011). Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PloS One*, 6(12), e28427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028427>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*, 29(10), 547-553. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Okumoto, S., Looger, L. L., Micheva, K. D., Reimer, R. J., Smith, S. J., & Frommer, W. B. (2005). Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8740-8745. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503274102>
- Palombo, M., Ligneul, C., Najac, C., Le Douce, J., Flament, J., Escartin, C., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., & Valette, J. (2016). New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), 6671-6676. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504327113>
- Palombo, M., Ligneul, C., & Valette, J. (2017). Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high diffusion-weighting: Diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 77(1), 343-350. <https://doi.org/10.1002/mrm.26548>
- Pauly, J., Le Roux, P., Nishimura, D., & Macovski, A. (1991). Parameter relations for the Shinnar-Le Roux selective excitation pulse design algorithm (NMR imaging). *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 10(1), 53-65. <https://doi.org/10.1109/42.75611>
- Peled, S., Cory, D. G., Raymond, S. A., Kirschner, D. A., & Jolesz, F. A. (1999). Water Diffusion, T2, and Compartmentation in Frog Sciatic Nerve. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine /*



- Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 42(5), 911-918.
- Pellerin, L. (2005). *How astrocytes feed hungry neurons*. 32, 59-72.
- Pellerin, L., & Magistretti, P. (s. d.). *Sweet Sixteen for ANLS*.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10625-10629.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N., & Magistretti, P. J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental Neuroscience*, 20(4-5), 291-299. <https://doi.org/10.1159/000017324>
- Pfeiffer, D., Möller, B., Klimes, N., Szeponik, J., & Fischer, S. (1997). Amperometric lactate oxidase catheter for real-time lactate monitoring based on thin film technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(6), 539-550. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00014-6)
- Pfeuffer, J., Tkáč, I., & Gruetter, R. (2000). Extracellular–Intracellular Distribution of Glucose and Lactate in the Rat Brain Assessed Noninvasively by Diffusion-Weighted <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *In Vivo*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(4), 736-746.  
<https://doi.org/10.1097/00004647-200004000-00011>
- Provencher, S. W. (1993). Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic Resonance in Medicine*, 30(6), 672-679.  
<https://doi.org/10.1002/mrm.1910300604>
- Purcell, E. M., Torrey, H. C., & Pound, R. V. (1946). Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*, 69(1-2), 37-38.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.69.37>
- Ramadan, S., Lin, A., & Stanwell, P. (2013). Glutamate and glutamine: A review of in vivo

- MRS in the human brain. *NMR in Biomedicine*, 26(12), 1630-1646.  
<https://doi.org/10.1002/nbm.3045>
- Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., & Singh, S. (2016). Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 35-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>
- Rattray, I., Smith, E., Gale, R., Matsumoto, K., Bates, G. P., & Modo, M. (2013). Correlations of Behavioral Deficits with Brain Pathology Assessed through Longitudinal MRI and Histopathology in the R6/2 Mouse Model of HD. *PLOS ONE*, 8(4), e60012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060012>
- Rémy, C., Fouilhé, N., Barba, I., Sam-Lai, E., Lahrech, H., Cucurella, M., Izquierdo, M., Moreno, A., Ziegler, A., Massarelli, R., Décorps, M., & Arús, C. (1997). Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer research*, 57, 407-414.
- Ripps, H., & Shen, W. (2012). Review: Taurine: A "very essential" amino acid. *Molecular Vision*, 18, 2673-2686.
- Roberts, E., & Frankel, S. (1950).  $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID IN BRAIN: ITS FORMATION FROM GLUTAMIC ACID. *Journal of Biological Chemistry*, 187(1), 55-63.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50929-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50929-2)
- Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., & Coyle, J. T. (1987). Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14498-14506.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47823-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47823-4)
- Rolfe, D. F., & Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews*, 77(3), 731-758.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>
- Ryan, D. G., & O'Neill, L. A. J. (2020). Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism. *Annual Review of Immunology*, 38(1), 289-313.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081619-104850>

- Sabbagh, J. J., Kinney, J. W., & Cummings, J. L. (2013). Alzheimer's disease biomarkers in animal models: Closing the translational gap. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2(2), 108-120.
- Salehi, A., Delcroix, J.-D., & Swaab, D. F. (2004). Alzheimer's disease and NGF signaling. *Journal of Neural Transmission*, 111(3), 323-345. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00702-003-0091-x>
- San Martín, A., Ceballo, S., Ruminot, I., Lerchundi, R., Frommer, W. B., & Barros, L. F. (2013). A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(2), e57712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057712>
- Saraste, M. (1999). *Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle*. 283(5407), 1488-1493. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1488>
- Scott, C., Szilagyi, G., Chavez, S., Ganda, A., & Black, S. (2011). Applications of Chemical Shift Imaging for AD. *Current Medical Imaging Reviews*, 7, 88-95. <https://doi.org/10.2174/157340511794653513>
- Shaw, G. M., Carmichael, S. L., Yang, W., Selvin, S., & Schaffer, D. M. (2004). Periconceptional Dietary Intake of Choline and Betaine and Neural Tube Defects in Offspring. *American Journal of Epidemiology*, 160(2), 102-109. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh187>
- Shemesh, N., Jespersen, S. N., Alexander, D. C., Cohen, Y., Drobnjak, I., Dyrby, T. B., Finsterbusch, J., Koch, M. A., Kuder, T., Laun, F., Lawrenz, M., Lundell, H., Mitra, P. P., Nilsson, M., Özarslan, E., Topgaard, D., & Westin, C.-F. (2016). Conventions and nomenclature for double diffusion encoding NMR and MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 75(1), 82-87. <https://doi.org/10.1002/mrm.25901>
- Shemesh, N., Rosenberg, J. T., Dumez, J.-N., Grant, S. C., & Frydman, L. (2017). Distinguishing neuronal from astrocytic subcellular microstructures using in vivo Double Diffusion Encoded <sup>1</sup>H MRS at 21.1 T. *PLoS ONE*, 12(10), e0185232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185232>
- Shulman, R. G., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Hyder, F. (2004). Energetic basis of brain

- activity: Implications for neuroimaging. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 489-495.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.005>
- Simmons, M. L., Frondoza, C. G., & Coyle, J. T. (1991). Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience*, 45(1), 37-45.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90101-S](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90101-S)
- Smith, D., Pernet, A., Hallett, W. A., Bingham, E., Marsden, P. K., & Amiel, S. A. (2003). Lactate: A Preferred Fuel for Human Brain Metabolism in Vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(6), 658-664.  
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000063991.19746.11>
- Smith, P. D., Sun, F., Park, K. K., Cai, B., Wang, C., Kuwako, K., Martinez-Carrasco, I., Connolly, L., & He, Z. (2009). SOCS3 Deletion Promotes Optic Nerve Regeneration In Vivo. *Neuron*, 64(5), 617-623. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.021>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid  $\beta$ -Protein Is an Antimicrobial Peptide. *PLOS ONE*, 5(3), e9505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>
- Stejskal, E. O., & Tanner, J. E. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1), 288-292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>
- Stokes, C. E., Gillon, K. R. W., & Hawthorne, J. N. (1983). Free and total lipid myo-inositol concentrations decrease with age in human brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 753(1), 136-138.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90108-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90108-X)
- Sturman, J. A., & Gaull, G. E. (1975). Taurine in the Brain and Liver of the Developing Human and Monkey. *Journal of Neurochemistry*, 25(6), 831-835.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb04414.x>

- Sturman, J. A., & Hayes, K. C. (1980). *The Biology of Taurine in Nutrition and Development* (H. H. Draper, Éd.; p. 231-299). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4448-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4448-4_9)
- Suhy, J., Rooney, W., Goodkin, D., Capizzano, A., Soher, B., Maudsley, A., Waubant, E., Andersson, P., & Weiner, M. (2000). 1H MRSI comparison of white matter and lesions in primary progressive and relapsing-remitting MS. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 6(3), 148-155.
- Sun, M., & Xu, C. (2008). Neuroprotective Mechanism of Taurine due to Up-regulating Calpastatin and Down-regulating Calpain and Caspase-3 during Focal Cerebral Ischemia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(4), 593-611. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9183-8>
- Tayebati, S. K., & Amenta, F. (2013). Choline-containing phospholipids: Relevance to brain functional pathways. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(3), 513-521. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0559>
- Taylor, D. L., Davies, S. E., Obrenovitch, T. P., Doheny, M. H., Patsalos, P. N., Clark, J. B., & Symon, L. (1995). Investigation into the role of N-acetylaspartate in cerebral osmoregulation. *Journal of Neurochemistry*, 65(1), 275-281. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010275.x>
- Tkác, I., Starcuk, Z., Choi, I. Y., & Gruetter, R. (1999). In vivo 1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine*, 41(4), 649-656. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2594\(199904\)41:4<649::aid-mrm2>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-2594(199904)41:4<649::aid-mrm2>3.0.co;2-g)
- Toker, A., & Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 387(6634), Article 6634. <https://doi.org/10.1038/42648>
- Torrey, H. C. (1956). Bloch Equations with Diffusion Terms. *Physical Review*, 104(3), 563-565. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.104.563>
- Urenjak, J., Williams, S., Gadian, D., & Noble, M. (1993). Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *The Journal of Neuroscience*, 13(3), 981-989. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13->

03-00981.1993

- Urenjak, J., Williams, S. R., Gadian, D. G., & Noble, M. (1992). Specific Expression of N-Acetylaspartate in Neurons, Oligodendrocyte-Type-2 Astrocyte Progenitors, and Immature Oligodendrocytes In Vitro. *Journal of Neurochemistry*, *59*(1), 55-61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08875.x>
- Valette, J., Giraudeau, C., Marchadour, C., Djemai, B., Geffroy, F., Ghaly, M. A., Le Bihan, D., Hantraye, P., Lebon, V., & Lethimonnier, F. (2012). A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magnetic Resonance in Medicine*, *68*(6), 1705-1712. <https://doi.org/10.1002/mrm.24193>
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Hantraye, P., Bloch, G., & Lebon, V. (2007). Isoflurane Strongly Affects the Diffusion of Intracellular Metabolites, as Shown by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the Monkey Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *27*(3), 588-596. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600353>
- Valette, J., Ligneul, C., Marchadour, C., Najac, C., & Palombo, M. (2018). Brain Metabolite Diffusion from Ultra-Short to Ultra-Long Time Scales: What Do We Learn, Where Should We Go? *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 2. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00002>
- van Gelder, N. M., Koyama, I., & Jasper, H. H. (1977). Taurine Treatment of Spontaneous Chronic Epilepsy in a Cat. *Epilepsia*, *18*(1), 45-54. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1977.tb05586.x>
- Vaquer-Alicea, J., & Diamond, M. I. (2019). Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Biochemistry*, *88*(1), 785-810. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045049>
- Varga Smith, M. (2023). 4—Anesthesia and Analgesia. In M. Varga Smith (Éd.), *Textbook of Rabbit Medicine (Third Edition)* (p. 138-155). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-8403-4.00004-1>
- Verkhratsky, A., Rodrigues, J. J., Pivoriunas, A., Zorec, R., & Semyanov, A. (2019).

- Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 471(10), 1247-1261. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02310-2>
- Viggiano, A., Marinesco, S., Pain, F., Meiller, A., & Gurden, H. (2012). Reconstruction of field excitatory post-synaptic potentials in the dentate gyrus from amperometric biosensor signals. *Journal of Neuroscience Methods*, 206(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.01.013>
- Vincent, M., Gaudin, M., Lucas-Torres, C., Wong, A., Escartin, C., & Valette, J. (2021). Characterizing extracellular diffusion properties using diffusion-weighted MRS of sucrose injected in mouse brain. *NMR in Biomedicine*, 34(4), e4478. <https://doi.org/10.1002/nbm.4478>
- Vincent, M., Palombo, M., & Valette, J. (2020). Revisiting double diffusion encoding MRS in the mouse brain at 11.7T: Which microstructural features are we sensitive to? *NeuroImage*, 207, 116399. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116399>
- Watford, M. (2015). Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? *Animal Nutrition*, 1(3), 119-122. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.008>
- Weber, B., & Barros, L. F. (2015). The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a020396. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020396>
- Wolff, J. R., & Chao, T. I. (2003). Cytoarchitectonics of non-neuronal cells in the central nervous system. In *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 31, p. 1-51). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(03\)31001-X](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(03)31001-X)
- Yang, J., Ruchti, E., Petit, J.-M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12228-12233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322912111>
- Zilberter, Y., Zilberter, T., & Bregestovski, P. (2010). Neuronal activity in vitro and the in vivo reality: The role of energy homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(9), 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.06.005>

### **Communication n°1. Séquence RMN in vivo supprimant la J-modulation pour mesurer la diffusion du lactate dans le cerveau de rongeurs**

**Evènement :** 5<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine – 27-29 septembre 2021, Lyon, France

**Organisation :** Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine (SFRMBM)

Abstract sélectionné pour une présentation orale

#### **Abstract :**

#### **Séquence RMN in vivo supprimant la J-modulation pour mesurer la diffusion du lactate dans le cerveau de rongeurs**

Sophie Malaquin<sup>1</sup>, Eloïse Mougel<sup>1</sup>, Mélissa Vincent<sup>1</sup>, Julien Valette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Molecular Imaging Research Center (MIRCen), Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Fontenay-aux-Roses, France.*

**Objectifs :** La faible concentration du lactate, comparée à celle des autres métabolites cérébraux, rend compliquée la mesure de sa diffusion et nécessite le développement de séquences RMN maximisant le rapport signal sur bruit. Nous comparons ici l'atténuation du signal en fonction de la pondération en diffusion ( $b$ ), obtenue *via* une séquence de référence (STE-LASER) ayant servi dans la plupart des travaux récents de notre groupe, ou une séquence utilisant une impulsion polychromatique ne refocalisant que les résonances d'intérêt, supprimant ainsi l'effet du couplage J sur la résonance du lactate à 1,31 ppm, résultant donc en une amélioration du signal.

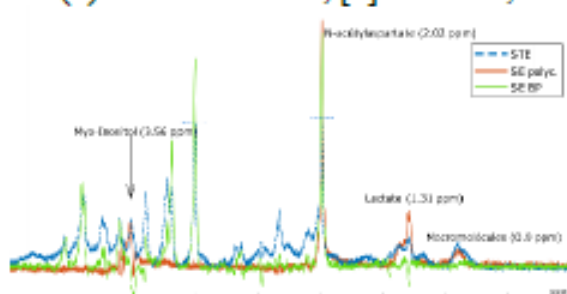
**Matériels et Méthodes :** quatre souris sauvages ont été scannées dans un IRM Bruker 11,7 T avec une cryosonde. La séquence STE-LASER comprend un module d'écho stimulé (trois impulsions large bande « broad pulse » bp) pondéré en diffusion ( $TE_{STE}/TM = 8,4/50$  ms) suivi d'un module de localisation adiabatique LASER [1] ( $TE_{LASER} = 25$  ms), tandis que la SE-LASER comprend un module d'écho de spin pondéré en diffusion ( $TE_{SE} = 58,3$  ms) suivi du même module LASER. Le timing des modules STE et SE est choisi pour que le temps de diffusion soit identique ( $t_d = 53,2$  ms). Pour la refocalisation, le module d'écho de spin utilise soit une impulsion bp, soit une impulsion polychromatique sélectionnant les macromolécules à 0,9 ppm, le NAA à 2,02 ppm, le m-inositol à 3,56 ppm, et le groupe CH<sub>3</sub> du lactate à 1,31, mais excluant le CH du lactate à 4,09 ppm avec laquelle le groupe CH<sub>3</sub> est couplé, ce supprime l'effet du couplage à l'écho (par ailleurs, l'effet du couplage pendant le module LASER est négligeable car il s'agit d'un train « CPMG » de 180°).



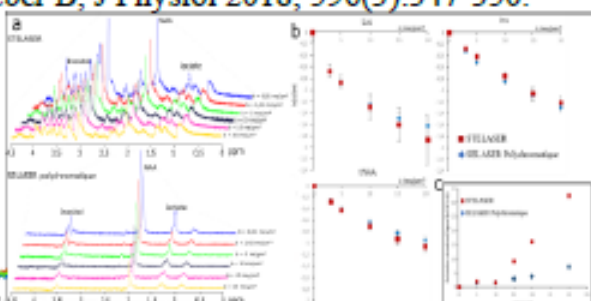
**Résultats :** Par rapport à la STE-LASER, la SE-LASER avec impulsion large bande présente un signal plus intense pour les singulets mais pas pour les métabolites avec couplage  $J$  comme le lactate. Par contre, avec la SE-LASER avec impulsion polychromatique, le gain sur le signal du lactate est spectaculaire (fig.1). L'atténuation du signal en fonction de  $b$  (fig.2-A-B) présente un profil assez similaire entre notre séquence de référence (STE-LASER) et la SE-LASER polychromatique (acquisitions effectuées pendant la même session pour chaque animal), mais la déviation standard est bien plus faible avec cette dernière séquence (fig.2-C).

**Conclusion :** L'utilisation de la séquence SE-LASER avec suppression du couplage  $J$  montre une bien meilleure précision à hautes valeurs de  $b$ . La comparaison de la diffusion du NAA (métabolite neuronal) et du myo-inositol (métabolite astrocytaire) avec celle du lactate permettra d'obtenir des informations sur la distribution du lactate dans ces types cellulaires, ce qui s'inscrit dans la recherche sur la navette lactate [2].

**Références :** [1] Ligneul C, Palombo M, Valette J, Magn. Reson. Med. 2017; 77(4):1390-13982017; [2] Barros L, Weber B, J Physiol 2018; 596(3):347-350.



**Figure1 :** Spectres sans pondération en diffusion obtenus avec la séquence STE-LASER (bleu), SE-LASER large bande (vert), et SE-LASER polychromatique (orange).



**Figure2 -A:** Jeux de données acquis expérimentalement pour différentes valeurs de  $b$  dans un voxel hippocampal de 31,5  $\mu$ L. **B :** atténuation du signal pour le NAA, Inositol, et lactate en fonction de  $b$ . **C :** déviation standard par rapport au signal en fonction de  $b$ .

## Communication n°2. Evaluation of a spectroscopy sequence using polychromatic refocusing to suppress J-modulation and measure lactate diffusion in the rodent brain

**Evènement :** 29<sup>th</sup> ISMRM & SMRT annual meeting & exhibition – 15-20 May 2021, online

**Organisation :** International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)

Abstract sélectionné pour un *digital poster*

### Abstract :

#### Evaluation of a spectroscopy sequence using polychromatic refocusing to suppress J-modulation and measure lactate diffusion in the rodent brain

Sophie Malaquin<sup>1</sup>, Eloïse Mougel<sup>1</sup>, Melissa Vincent<sup>1</sup>, and Julien Valette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay aux Roses, France

### Synopsis

Diffusion-weighted NMR spectroscopy allows non-invasive measurement of the diffusion properties of brain metabolites. Lactate is of particular interest but has low concentration thus requiring the development of new sequences to maximize signal-to-noise ratio. In this work, we compare a reference stimulated echo sequence and two spin echo sequences using either a broad pulse, or a selective polychromatic pulse suppressing J-modulation, by measuring the signal attenuation as a function of diffusion-weighting. Suppression of J-modulation with the polychromatic spin echo sequence leads to a significant signal gain and a better precision in lactate signal attenuation.

### Introduction

In vivo diffusion-weighted NMR spectroscopy (DW-MRS) allows measuring metabolite diffusion properties in the brain, and therefore to derive information about the microstructural environment they diffuse in. The low lactate concentration, compared to other metabolites, makes this measurement difficult and requires the development of new DW-MRS sequences maximizing lactate signal to-noise ratio. We compare the signal attenuation as a function of diffusion-weighting  $b$ , between a reference sequence (STE-LASER)<sup>1</sup>, as used in most of our recent works, and a spin echo sequence (SE-LASER) where the DW spin-echo part relies on a polychromatic pulse refocusing only the resonances of interest, therefore suppressing J-modulation on lactate resonance at 1.31 ppm.

### Methods

Four wild-type mice were scanned on an 11.7 T Bruker system with a quadrature surface cryoprobe. The STE-LASER sequence (fig.1a) starts by a diffusion-weighting stimulated echo block (three broad pulses,  $TE_{STE}/TM=8.4/50$  ms,  $\delta/\Delta=3/53.2$  ms), and is followed by a LASER adiabatic localization block ( $TE_{LASER}=25$  ms). The SE-LASER sequence consists of a diffusion-weighting spin echo block ( $TE_{SE}=58.3$  ms) with the same diffusion timing as the STE-LASER ( $\delta/\Delta=3/53.2$  ms), followed by the same LASER block (fig.1). The sequence starts with a 90° adiabatic excitation pulse. For the refocusing, the spin echo block uses either a broad pulse (to assess the sole benefit of using a spin echo compared to a stimulated echo, fig.1b), or a polychromatic pulse (fig.1c). This pulse is inspired from works by Shemesh et al.<sup>2,3</sup> and is designed using the Shinnar-Le Roux algorithm. Its advantage relies on its high selectivity: by choosing carefully the 180° pulse bandwidth, we can target only the resonances of interest. In this work, in order to simultaneously measure the diffusion of lactate and of metabolites with specific cellular compartmentation, we chose to excite NAA (neuronal marker) at 2.02 ppm, myo-inositol (astrocytic marker) at 3.56 ppm and the CH<sub>3</sub> lactate group at 1.31 ppm, and to exclude the CH lactate group at 4.09 ppm which the CH<sub>2</sub> group is coupled with. This allows for the suppression of the J-coupling effect on the 1.31 ppm resonance at the echo (moreover, the J-coupling effect during the LASER block is negligible since it consists in a CPMG refocusing train). First, spectra were acquired in a 31.5  $\mu$ L hippocampal voxel of interest without diffusion-weighting ( $b=0.02$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>, 128 repeats) with the three sequences (STE-LASER, broad pulse SE-LASER, polychromatic SE-LASER), for signal comparison. Then, the spectra were acquired at six different  $b$ -values ( $b=0.02, 3.02, 5, 10, 15$  and 20 ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>, TR=2000 ms, 128 repeats), with the STE-LASER sequence and the polychromatic SE-LASER sequence (the full set of measurements was performed in each mouse during the same session). Spectra were analyzed with LCModel<sup>4</sup>. Experimental macromolecule spectra were included in LCModel basis-sets. Note that the polychromatic pulse was designed to also refocus the macromolecule resonance at 0.9 ppm to feed LCModel with extra information to reliably quantify macromolecule signal overlapping with lactate at 1.31 ppm (fig.3b).

### Results and discussion

The use of a stimulated echo in the STE-LASER sequence results in the loss of half of the signal compared to a spin echo. The broad pulse SE-LASER sequence allows for partially recovering signal despite longer TE (fig.2a), but only for singlets such as NAA, tCho and tCr, not for lactate. The polychromatic SE-LASER sequence allows for a similar signal increase for NAA, and a spectacular lactate signal gain (fig.2b). Comparison of signal attenuation as measured with the reference STE-LASER sequence and the polychromatic SE-LASER sequence confirms the interest of using the latter for measuring lactate diffusion at high  $b$ : while mean signal attenuation is comparable between both sequences (i.e. there is no apparent bias) (fig.3), standard deviation on lactate signal attenuation as measured across the four animals is consistently lower with the polychromatic SE-LASER sequence, in particular at the highest  $b$ -values (fig.4).

## Conclusion

This work shows that J-modulation suppression provided by the polychromatic SE-LASER sequence leads to a significant increase in lactate signal intensity, in turn resulting in better precision up to higher b-values. In the future, the comparison of lactate diffusion with NAA (neuronal metabolite), and with myo-inositol (astroglial metabolite) may provide information on lactate distribution in these cellular types (as tentatively done previously<sup>5</sup>) leading to a better understanding of the lactate shuttle<sup>6</sup>.

## Acknowledgements

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programs (grant agreement n° 818266)

## References

1. Ligneul, C., Palombo, M. and Valette, J. Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magn. Reson. Med.*, 2017;77: 1390-1398.
2. Shemesh, N., Rosenberg, J., Dumez, JN. et al. Metabolic properties in stroked rats revealed by relaxation-enhanced magnetic resonance spectroscopy at ultrahigh fields. *Nat Commun* 5, 2014; 4958. 3. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993;30:672-679 Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993;30:672-679
3. Shemesh N, Rosenberg JT, Dumez JN, Grant SC, Frydman L. Distinguishing neuronal from astrocytic subcellular microstructures using in vivo Double Diffusion Encoded 1H MRS at 21.1 T. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185232.
4. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993;30:672-679
5. Ligneul C, Palombo M, Hernández-Garzón E, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo. *Neuroimage.* 2019 May 1;191:457-469.
6. Barros LF, Weber B. CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *J Physiol.* 2018;596(3):347-350.

## Figures

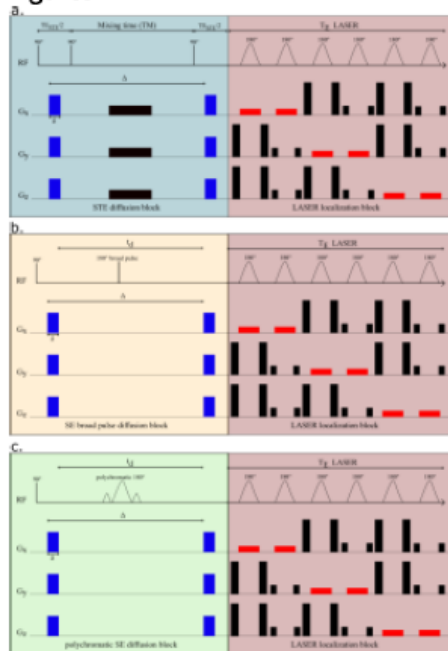


Figure 1: STE-LASER and SE-LASER MRS sequences. The diffusion block is followed by an adiabatic LASER localization module. Diffusion gradients are shown in blue, crusher gradients in black, and slice selective gradients in red. a: STE-LASER sequence. b: broad pulse SE-LASER sequence. The refocusing pulse is a 180° broad pulse. c: polychromatic SE-LASER sequence. The refocusing pulse is a 180° polychromatic pulse, targeting the NAA resonance at 2.02 ppm, the m-Ins resonance at 3.56 ppm, the lactate resonance at 1.31 ppm and the macromolecules resonance at 0.9 ppm.

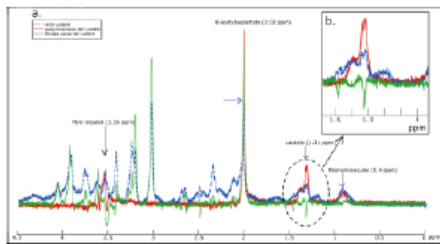


Figure 2: a. Spectra without diffusion-weighting obtained with the STE-LASER sequence (blue dotted line), the broad pulse SE-LASER sequence (green line) and the polychromatic SE-LASER sequence (red line). b. The gain of lactate signal is spectacular when using the polychromatic SE-LASER sequence.

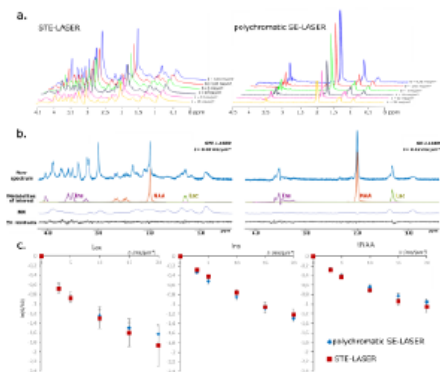


Figure 3: STE-LASER and polychromatic SE-LASER data at high diffusion-weighting in WT mice. a. Spectra acquired up to high diffusion-weighting (from  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  to  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) with the STE-LASER sequence (left) and the polychromatic SE-LASER sequence (right). b. LCMoDel analysis for metabolites of interest. Macromolecules contribution on 1.31 ppm lactate peak is noticeable. c. Signal attenuation as a function of  $b$  for three metabolites by using the two sequences (blue diamonds = polychromatic SE-LASER, red squares = STE-LASER). Data points and error bars stand for mean  $\pm$  s.d.

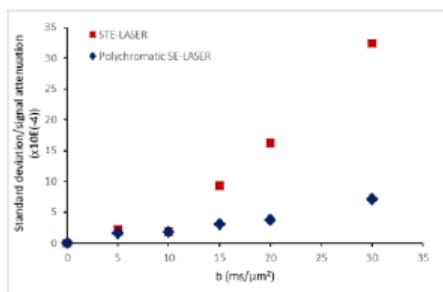


Figure 4: standard deviation over signal attenuation ( $sd(S/S_0)$ ) as a function of  $b$  calculated across the four animals from the data acquired with the STE-LASER sequence (blue diamond) and with the polychromatic SE-LASER sequence (red squares).

## Communication n°3. How modeling lactate diffusion may inform on its cellular compartmentation? An initial study

**Evènement :** 30<sup>th</sup> ISMRM & SMRT annual meeting & exhibition – 07-15 May 2022, Londres, Royaume-Uni

**Organisation :** International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)

Abstract sélectionné pour une présentation poster en format digital

### Abstract :

#### How modeling lactate diffusion may inform on its cellular compartmentation? An initial study

Sophie Malaquin<sup>1</sup> and Julien Valette<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Molecular Imaging Research Center (MIRCe), Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay aux Roses, France

### Synopsis

Brain lactate compartmentation in neurons, astrocytes and the extracellular space is presumably of critical importance, but remains impossible to assess non-invasively. DW-MRS of lactate might capture lactate fractions in each compartment, provided these compartments induce different diffusion properties. Here we propose a framework where diffusion of cell-specific metabolites (Ins and NAA) is modeled to predict lactate diffusion in astrocytes and neurons. We use some “realistic” (spheres+cylinders) and simplified (cylinders) models of cell microstructure to show that lactate fractions in each compartment can be accurately estimated, despite inaccurate microstructure modeling. Models are finally tested on *in vivo* mouse brain data.

### Introduction

The distribution of brain lactate (Lac) between neurons, glial cells (particularly astrocytes) and the extracellular space (ECS), is presumably of fundamental importance for brain function, *via* the astrocyte-to-neuron lactate shuttle<sup>1</sup>, which requires a concentration gradient  $[Lac]_{astro} > [Lac]_{ECS} > [Lac]_{neuron}$ <sup>2</sup>. However, assessing lactate compartmentation is not yet possible using non-invasive techniques. Because diffusion as measured with diffusion-weighted (DW) MRS depends on the surrounding microstructure, lactate diffusion may inform about the compartments where it is diffusing, provided neurons, astrocytes and ECS induce different enough diffusion properties. Such idea guided some semi-quantitative estimation of intracellular-extracellular lactate fractions<sup>3</sup> and, more recently, some qualitative discussion about lactate fraction in astrocytes *versus* neurons<sup>4</sup>.

Here we present initial developments to quantify lactate fraction in neurons, astrocytes and ECS. The general framework is the following (fig.1):

1. DW-signal of astrocytic myo-inositol (Ins) and neuronal NAA and is *fitted*, using some microstructure models, to extract relevant astrocytic and neuronal and microstructural parameters, and intracellular diffusivities  $D_{intra}$ .
2. DW-signal of lactate within astrocytes ( $S_{astro}$ ) and neurons ( $S_{neuron}$ ) is *predicted*, using the models and microstructural parameters estimated in step 1, but with larger  $D_{intra}$  than Ins and NAA, reflecting faster diffusivity of lactate.
3. DW-signal of lactate is *fitted* using a three-compartment model, by varying the fraction in each compartment, with  $S_{astro}$  and  $S_{neuron}$  precomputed in step 2:

$$S = f_{astro} \times S_{astro} + f_{neuron} \times S_{neuron} + (1 - f_{astro} - f_{neuron}) \times S_{ECS} [1]$$

For  $S_{ECS}$ , prior knowledge is used (e.g. Gaussian diffusion).

Central to that framework are the microstructure models for neurons and astrocytes. How exact do those models need to be? Are approximate models yielding biased microstructural parameters still good enough to yield accurate lactate fractions? To investigate this question, we simulate DW-signal with a “realistic model” where cells consist of spheres and cylinders (e.g. like the SANDI model<sup>5</sup>), and fit them using a simplified model consisting of cylinders only<sup>6</sup>. We then try modeling *in vivo* data.

## Methods

**Generating astrocytic Ins and neuronal NAA DW-signal:** DW-signal in fibers  $S_{fiber}$  as a function of diffusion-weighting  $b$  is computed with equations for isotropically oriented cylinders with radius  $r_{fiber}$  and  $D_{intra}$ <sup>6,7</sup>. DW-signal in soma  $S_{soma}$  is computed with equations for spheres of radius  $r_{soma}$  and  $D_{intra}$ <sup>6</sup>. For each cellular compartment, we consider an 80/20 % fiber/soma volume ratio<sup>4</sup>:

$$S(b) = 0.8 \times S_{fiber}(r_{fiber}, D_{intra}, b) + 0.8 \times S_{soma}(r_{soma}, D_{intra}, b)[2]$$

Eq.2 is used to simulate Ins and NAA DW-signal, with  $r_{soma}=3.8 \mu m$ ,  $r_{fiber}=1.3 \mu m$  and  $D_{intra}(Ins)=0.37 \mu m^2/ms$  in astrocytes, and  $r_{soma}=3.8 \mu m$ ,  $r_{fiber}=0.7 \mu m$  and  $D_{intra}(NAA)=0.35 \mu m^2/ms$  in neurons<sup>4</sup>. Here we assume 100%-astrocytic specificity for Ins and 100%-neuronal specificity for NAA. **Generating lactate DW-signal with three-compartment model:** for lactate, the intracellular diffusivities  $D_{astro}$  and  $D_{neuro}$  are determined as:

$$D_{astro} = D_{free}(Lac) \times \frac{D_{intra}(Ins)}{D_{free}(Ins)} [3]$$

$$D_{neuro} = D_{free}(Lac) \times \frac{D_{intra}(NAA)}{D_{free}(NAA)} [4]$$

$D_{free}$  is the free diffusion coefficient as measured in phantoms ( $D_{free}(Ins)=0.76 \mu m^2/ms$ ;  $D_{free}(NAA)=0.75 \mu m^2/ms$ ; and  $D_{free}(Lac)=0.99 \mu m^2/ms$ ).

Lactate DW-signal in astrocytes  $S_{astro}$  and in neurons  $S_{neuron}$  is simulated using Eq.2, while in ECS it is simulated by monoexponential attenuation ( $D_{extra}=0.49 \mu m^2/ms$ ). Finally, total lactate signal is computed using Eq.1.

**Fitting synthetic DW-signals:** synthetic Ins and NAA DW-signals are fitted with  $S_{fiber}$  only, leading to effective astrocytic and neuronal  $r_{fiber}$ ,  $D_{intra}(Ins)$  and  $D_{intra}(NAA)$ .  $D_{astro}$  and  $D_{neuro}$  for lactate were estimated according to Eq.3-4 to then compute  $S_{astro}$  and  $S_{neuro}$  using  $S_{fiber}$ , ultimately feeding the three-compartment model to fit lactate DW-signal (Eq.1). For diffusion in ECS,  $D_{extra}$  is left as free parameter, eventually leaving only  $f_{neuron}$ ,  $f_{astro}$  and  $D_{extra}$  as free parameters in Eq.1. Fitting is performed by non-linear least square regression implemented in MATLAB.

**Experimental data:** Four mice anesthetized with ~1.5% isoflurane were scanned on an 11.7 T Bruker system with a quadrature surface cryoprobe, using a polychromatic SE-LASER sequence<sup>8</sup> ( $TE_{SE}/\delta/\Delta=58.3/ 3/53.2$  ms) at six different  $b$ -values ( $b=0.02, 3.02, 5, 10, 15$  and  $20$  ms/ $\mu m^2$ , 128 repeats) in a 31.5  $\mu L$  hippocampal voxel.

## Results and discussion

Fiber radii estimated with  $S_{fiber}$  for Ins and NAA were larger than true fiber radii, as expected due to actual soma contribution (with  $r_{soma} \gg r_{fiber}$ ), and  $D_{intra}$  were smaller (fig.2a-b).

Informed by the fiber-only fit of Ins and NAA, we could fit synthetic Lac DW-signal with the three-compartment model, for data generated with the full model using  $f_{astro}=50\%$ ,  $f_{neuron}=20\%$ , and  $f_{ECS}=1-f_{astro}-f_{neuron}=30\%$  (Fig.2c-d). The fit appears very close to simulated signal up to  $b=50$  ms/ $\mu m^2$  (which is extremely challenging to achieve experimentally, due to SNR). Estimated fractions ( $f_{astro}=53\%$ ,  $f_{neuron}=20\%$ ,  $f_{ECS}=27\%$ ) are consistent with the nominal ones.

We then decided to simulate different Lac DW-signal for a broad range of  $f_{astro}$  and  $f_{neuron}$ . Fractions obtained from fitting always remain reasonably accurate (Fig.3).

*In vivo* data were analyzed with the fiber-only model (like for the synthetic signals), but also with the spheres+cylinders model for comparison. In the latter case, we used the 80/20% fiber/soma volume ratio as priors, but let  $r_{soma}$ ,  $r_{fiber}$  and  $D_{intra}$  as free parameters when fitting Ins and NAA data. Results for Ins and NAA are reported in Fig.4. Results for Lac are shown in Fig.5. Estimated fractions are quite close for both models, pointing towards lactate being predominantly in astrocytes.

## Conclusion

This work shows that even simplistic models, providing biased microstructural parameter values, may actually be used to estimate lactate volume fractions with good accuracy. Such robustness gives confidence in the general framework proposed here to estimate brain lactate compartmentation.

## Acknowledgements

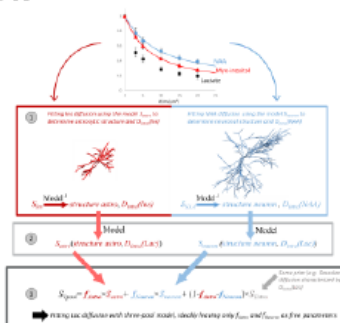
This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programmes (grant agreement n° 818266)

## References

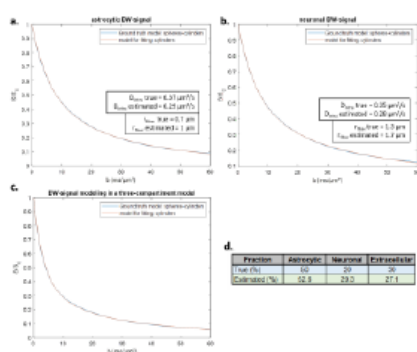
1. Barros LF, Weber B. CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain. *J Physiol*. 2018;596(3):347-350.
2. Mächler, P., Wyss, M. T., Elsayed, M., Stobart, J., Gutierrez, R., Von Faber-Castell, A., Kaelin, V., Zuend, M., San Martín, A., Romero-Gómez, I., Baeza-Lehnert, F., Lengacher, S., Schneider, B. L., Aebischer, P., Magistretti, P. J., Barros, L. F., & Weber, B. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism*, 2016, 23(1), 94–102.
3. Pfeuffer J, Tkáč I, Gruetter R. Extracellular–Intracellular Distribution of Glucose and Lactate in the Rat Brain Assessed Noninvasively by Diffusion-Weighted 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy In Vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2000;20(4): 736-746.
4. Ligneul C, Palombo M, Hernández-Garzón E, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo. *Neuroimage*. 2019 May 1;191:457-469.
5. Palombo M, Ianus A, Guerreri M, Nunes D, Alexander DC, Shemesh N, Zhang H. SANDI: A compartment-based model for non-invasive apparent soma and neurite imaging by diffusion MRI. *Neuroimage*. 2020 Jul 15;215:116835.

6. Palombo, M., Ligneul, C. and Valette, J. Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high diffusion-weighting: Diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation. *Magn. Reson. Med.* 2017; 77: 343-350.
7. P. Linse, O. Soderman, The Validity of the Short-Gradient-Pulse Approximation in NMR Studies of Restricted Diffusion. *Simulations of Molecules Diffusing between Planes, in Cylinders and Spheres*, Journal of Magnetic Resonance, 1995, Series A, Volume 116, Issue 1, 77-86
8. Malaquin, S., Mougel, E., Vincent, M., & Valette, J. Evaluation of a spectroscopy sequence using polychromatic refocusing to suppress J-modulation and measure lactate diffusion in the rodent brain. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 2021, 29, 2199.

**Figures**



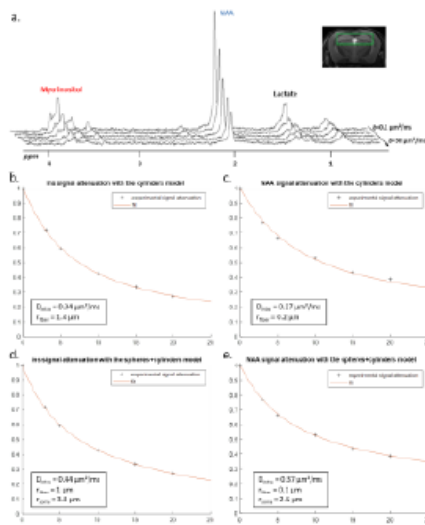
**Figure 1:** 1. DW-attenuation of NAA and Ins is fitted, using some microstructure models. 2. DW-attenuation of lactate within neurons ( $S_{\text{neuron}}$ ) and astrocytes ( $S_{\text{astro}}$ ) is predicted, using the models and microstructural parameters estimated in step 1. 3. DW-attenuation of lactate is fitted using a three-compartment model by varying the fraction in each compartment, with  $S_{\text{neuron}}$  and  $S_{\text{astro}}$  as computed in step 2. For  $S_{\text{ECS}}$ , prior knowledge is used (e.g. Gaussian diffusion).



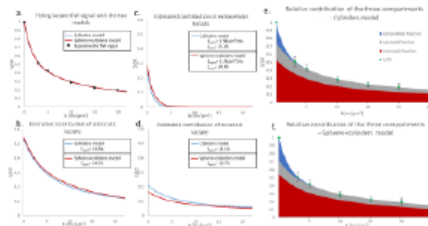
**Figure 2:** Signal attenuation was simulated using the spheres+cylinders model and fitted using the cylinders model in a case of a. pure astrocytic diffusion, b. pure neuronal diffusion, and c. diffusion in a model of 3 compartments (astrocytes, neurons, and extracellular space). The radii of the neuronal and astrocytic fibers were imposed for the simulation ( $r_{\text{fiber}}$  true) and retrieved from the fitting ( $r_{\text{fiber}}$  estimated). The signal contribution for each compartment is given in d.

Fraction	Astrocytic	Neuronal	Extracellular
True (%)	1	90	9
Estimated (%)	4.5	94.9	0.6
True (%)	10	70	20
Estimated (%)	13	73.7	13.3
True (%)	20	50	30
Estimated (%)	22.6	52.4	25
True (%)	30	30	40
Estimated (%)	32.2	31.2	36.8
True (%)	50	20	30
Estimated (%)	52.6	20.3	27.1
True (%)	70	10	20
Estimated (%)	72.9	9.4	17.7
True (%)	90	1	9
Estimated (%)	92.7	0.2	7.1

**Figure 3:** Signal attenuation was simulated using the spheres+cylinders model and fitted using the cylinders model for different contributions for each compartment. The fractions were imposed for the simulation.



**Figure 4:** The two simulation models were used on a. data obtained *in vivo*, and Ins and NAA signal attenuation was modeled with the cylinders model (b. and c. respectively) and the spheres+cylinders model (d. and e. respectively).



**Figure 5:** a. Fit of *in vivo* Lac DW-signal using both models. Individual contributions of the b. extracellular, c. astrocytic and d. neuronal compartments are compared for the two models. Lac fractions are given for each compartment depending on the model used. Estimated  $D_{extra}$  with the cylinders model (C) and the spheres and cylinders model (S&C) are shown in c. Alternatively, the contribution of the three-compartments is shown for the e. cylinders model and f. spheres+cylinders model.



## **Communication n°4. Investigating changes in brain lactate compartmentation using diffusion-weighted MRS in APP/PS1 mice**

**Evènement :** Translational Neuroscience day – 6 décembre 2022, Paris, France

**Organisation :** NeurATRIS et Celphedia

Abstract sélectionné pour une présentation poster

**Abstract :**

### **Investigating changes in brain lactate compartmentation using diffusion-weighted MRS in APP/PS1 mice**

Sophie Malaquin<sup>1</sup>, Eloïse Mougel<sup>1</sup>, Rodrigo Lerchundi<sup>1</sup> and Julien Valette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Université Paris-Saclay, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay aux Roses, France*

**Introduction:** Diffusion-weighted MR spectroscopy (DW-MRS) allows characterizing metabolite diffusion properties in the brain and may thus yield information about the microstructural environment in which these metabolites are diffusing. Therefore, it can be possible to obtain cell-specific microstructural information by measuring the diffusion of neuron-specific metabolites such as N-acetylaspartate (NAA) and of astrocyte-specific metabolites such as myo-inositol (Ins). Since lactate is present in astrocytes, neurons, and in the extracellular space, its diffusion properties are expected to reflect specific signatures of intra-neuronal, intra-astrocytic, and extracellular diffusion, in proportions directly reflecting the fraction of lactate in each of these compartments.

The goal of this work is to evaluate the ability of DW-MRS to non-invasively capture variations of lactate compartmentation, in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease (which exhibits features such as the accumulation of amyloid plaques in the brain extracellular space, decreased levels of NAA and increased levels of taurine and lactate). We use an optimized DW-MRS sequence with polychromatic refocusing pulses to measure DW-signal attenuation of lactate with increased precision, as well as NAA and Ins diffusion. Data modeling is performed to tentatively explain the origins of potential variations of lactate diffusion.

**Methods:** Six heterozygous APP/PS1 mice and six WT littermates anesthetized with ~1% isoflurane were scanned on an 11.7 T Bruker system with a quadrature surface cryoprobe in a 15  $\mu$ L cortical voxel. DW-MRS measurements were acquired using a home-made polychromatic SE-LASER sequence which consists of a polychromatic echo pulse targeting NAA, myo-inositol, lactate at 1.31 ppm, and macromolecule (MM) at 0.9 ppm, surrounded by a pair of diffusion gradients ( $\delta/\Delta = 3.1/53.2$  ms); followed by a LASER localization block (yielding a total TE of 83.4 ms). Acquisitions were performed at four different diffusion-weighting values ( $b = 0.02, 3.02, 10$  and  $20$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>, TR = 2000 ms, 256 repetitions in total for each  $b$ ). Importantly,  $b$ -values were acquired in an interlaced manner, i.e. the  $b$ -value was changed for each repetition. Furthermore, to avoid bias due to potential diffusion anisotropy in the voxel, powder averaging was performed, i.e. diffusion gradient orientation was modified for

each cycle of  $b$ -values to uniformly cover the surface of a sphere.

Spectra were processed with Matlab and analyzed with LCMoDel. Note that experimental MM spectra were acquired (using double-inversion-recovery and  $b = 10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) for inclusion in LCMoDel basis sets.

Results and discussion: Group-averaged DW-spectra are shown in fig.1A. No difference between groups was observed for MM spectra, so that they were pooled to increase SNR. Lactate peak at 1.31 ppm remains clearly visible even at the largest  $b$ -value, and visually appears to decrease slightly faster in the control group. Overall, while Ins and NAA signal attenuations remain very close in both groups, lactate signal is significantly less attenuated in APP/PS1 (Student's  $t$ -tests,  $p < 0.01$ ). This suggests that, because astrocytic and neuronal microstructures remain globally unchanged in APP/PS1 mice (i.e., when averaged across the voxel), slower lactate diffusion might be due to either a smaller fraction of extracellular lactate (since diffusion occurs faster in ECS<sup>10</sup>), or to hindered diffusion in the extracellular space due to the presence of amyloid aggregates. Interestingly, the overall lactate concentration as assessed without diffusion-weighting was similar in both groups.

DW-signals of NAA and Ins were modeled to estimate cell microstructure and then predict lactate diffusion in intracellular space, using a sphere+cylinder model<sup>11</sup>. In this work, tNAA and Ins signals in both groups appear too similar to differentiate astrocytic and neuronal diffusion in both groups; therefore we decided to average the four intracellular DW-signals (tNAA and Ins in both groups) to extract some average cell microstructure parameters and average NAA/Ins intracellular diffusivity (fig.3A.). DW-signal of lactate was then *fitted* in each group using a two-compartment model (intra and extracellular space), assuming Gaussian diffusion in the extracellular space and letting extracellular fraction  $f_{\text{extra}}$  and extracellular diffusivity  $D_{\text{extra}}$  as free parameters (fig 3B). Modeling yields relatively unaltered  $D_{\text{extra}}$ , but quite lower  $f_{\text{extra}}$  in the APP/PS1 group.

Ultimately, lower extracellular lactate fraction might be due either to decreased extracellular volume fraction, or to decreased lactate concentration in the extracellular space. To help decipher which hypothesis is most likely to explain this variation, measurements of lactate concentration in the extracellular space using implanted enzyme-electrodes<sup>12</sup> are currently underway.

Conclusion: DW-MRS could successfully detect variations of lactate diffusion in a mouse model of neurodegenerative disease (APP/PS1). Modeling suggests that such variations were due to decreased extracellular lactate fraction. While the ultimate cause for such decreased fraction remains to be elucidated, e.g. using invasive reference techniques such as enzyme-electrodes, we believe that enhancing DW-MRS data, e.g. with double diffusion encoding<sup>13</sup>, may provide richer information<sup>14</sup> leading to more robust modeling of lactate compartmentation, which for now remains quite fragile.

Acknowledgments: This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programs (grant agreement n° 818266)

11.7T scanner was funded by NeurATRIS ("Investissements d'Avenir", ANR-11-INBS-0011).

# Investigating changes in brain lactate compartmentation using in vivo MR spectroscopy in APP/PS1 mouse

Sophie MALAQUIN<sup>1</sup>, Eloïse MOUGEL<sup>1</sup>, Rodrigo LERCHUNDI<sup>1</sup>, Julien VALETTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRcen, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses, France

## Introduction

Diffusion-weighted MR spectroscopy (DW-MRS) allows characterizing metabolite diffusion properties in the brain, and may thus yield information about the microstructural environment these metabolites are diffusing in<sup>1</sup>.

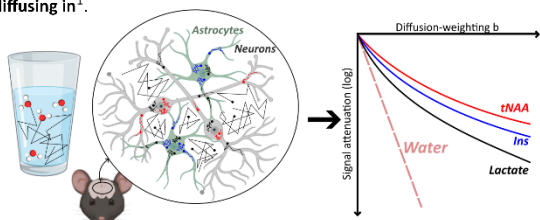


Figure 1: illustration of metabolite diffusion properties in the mouse brain compared to water

It can be possible to obtain cell-specific microstructural information by measuring the diffusion of neuron-specific N-acetylaspartate<sup>2</sup> (tNAA) and of astrocyte-specific myo-inositol<sup>3</sup> (Ins).

Since lactate is present in neurons, astrocytes, and extracellular space (ECS)<sup>4</sup>, its diffusion properties are expected to reflect specific signatures of the three compartments in proportions directly reflecting the fraction of lactate in each compartment.

We compare the diffusion properties of these metabolites in the brain of APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease<sup>5</sup> versus healthy ones to non-invasively capture variations in lactate compartmentation<sup>6</sup>.

## Methods

- 6 APP/PS1 mice and 6 WT littermates
- 12 month old
- Anesthetized with 1% isoflurane
- 11.7 T Bruker MRI
- With cryoprobe

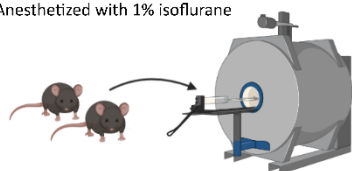


Figure 2: illustration of the experimental setup

- Sequence: home-made polychromatic SE-LASER<sup>7</sup> ( $\delta/\Delta = 3.1/53.2$  ms)
- b-values = 0.02; 3.02; 10 and 20 ms/ $\mu\text{m}^2$
- TR = 2000 ms; TE = 83.4 ms, 8x32 repetitions

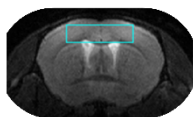


Figure 3: 15  $\mu\text{L}$  voxel centered on the cortex

References: [1] Palombo M. et al., *NeuroImage*, 2018. [2] Simmons M. et al., *Neuroscience*, 1991. [3] Choi J. et al., *NMR biomed*, 2007. [4] Mächler P. et al., *Cell metabolism*, 2016. [5] Newington J. et al., *J Neurodegener Dis*, 2013. [6] Ligneul C. et al., *NeuroImage*, 2019. [7] Maugef E. et al., *J Magn Reson*, 2022. [8] Malaquin S. and Valette J., *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 2022. [9] Vincent M. et al., *NeuroImage*, 2020.

Fundings: ERC project Lactadiff (H2020, grant agreement n° 818266) 11.7 T scanner was funded by NeurATRIS ("Investissements d'Avenir", ANR-11-INBS-0011).

## Results

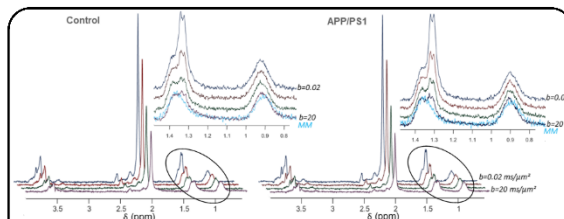


Figure 4: Spectra acquired in control and APP/PS1 groups up to high b-values. Macromolecules spectra are superimposed on the spectra at the highest b.

Lactate peak: clearly visible at the largest b-value  
 ↘ faster in control group

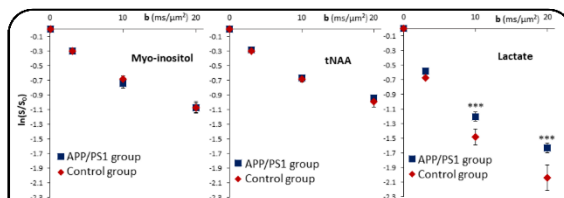


Figure 5: DW-signal attenuation as a function of b for tNAA, Ins, and lactate in both groups

### DW-signal attenuations

Ins and tNAA remain very close  
 → Astrocytic and neuronal  $\mu$ structures unchanged

Lactate significantly less attenuated in APP/PS1 (Student's t-tests,  $p < 0.01$ )  
 → Smaller fraction of EC lactate or hindered diffusion in the ECS

### Modeling

Dextra relatively unaltered  
 ↘ fextra in the APP/PS1 group

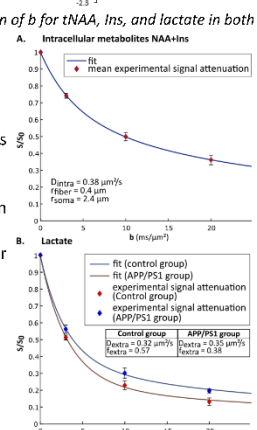


Figure 6: Fit, using a two-compartment model<sup>8</sup> of A. signal attenuation averaged for Ins and tNAA and for both groups B. lactate signal attenuation for each group ( $D_{\text{extra}}$  and  $f_{\text{extra}}$  are free parameters)

## Conclusion

DW-MRS → detection of variations of lactate diffusion  
 Modeling → variations due to decreased extracellular lactate fraction

- Use of invasive reference techniques to elucidate the cause of decreased  $f_{\text{extra}}$
- Enhancing DW-MRS data with double diffusion encoding<sup>9</sup> to provide richer information
- more robust modeling

## **Communication n°5. Etude des modifications de compartimentation du lactate cérébral par DW-MRS chez des souris APP/PS1**

**Evènement :** 6<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine – 27-29 mars 2022, Paris, France

**Organisation :** Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine (SFRMBM)

Abstract sélectionné pour une présentation orale

### **Abstract :**

#### **Etude des modifications de compartimentation du lactate cérébral par DW-MRS chez des souris APP/PS1**

**Sophie Malaquin<sup>1</sup>, Eloïse Mougel<sup>1</sup>, Rodrigo Lerchundi<sup>1</sup>, Julien Valette<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des Maladies*

*Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses*

**Objectifs :** La spectroscopie RMN pondérée en diffusion (DW-MRS) permet de caractériser les propriétés de diffusion des métabolites, ce qui informe sur la microstructure de l'environnement dans lequel ils diffusent<sup>1</sup>. Ici, nous mesurons la diffusion de deux métabolites intracellulaires (IC), le myo-inositol (Ins) astrocytaire et le N-acétyl-aspartate (NAA) neuronal, ainsi que le lactate (Lac) également présent dans le milieu extracellulaire (ECS), dans le cortex de souris APP/PS1, afin de détecter d'éventuels changements de compartimentation du lactate

**Matériels et Méthodes :** 6 souris APP/PS1 et 6 souris WT âgées de 12 mois ont été scannées dans un IRM Bruker 11,7 T avec une cryosonde sous 1% d'isoflurane dans un voxel cortical de 15  $\mu$ L. Les mesures de diffusion ont été acquises avec une séquence SE-LASER<sup>2</sup> utilisant une impulsion polychromatique puis un bloc de localisation LASER (TE/TR=83,4/2000 ms). Les acquisitions ont été moyennées sur 32 directions différentes pour 4 valeurs de pondération en diffusion entrelacées ( $b = 0,02, 3,02, 10$  et  $20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ,  $4 \times 32 = 256$  répétitions acquises au total pour chaque  $b$ ). Ce schéma d'acquisition permet de s'affranchir de dérives temporelles et de

l'anisotropie éventuelle du voxel.

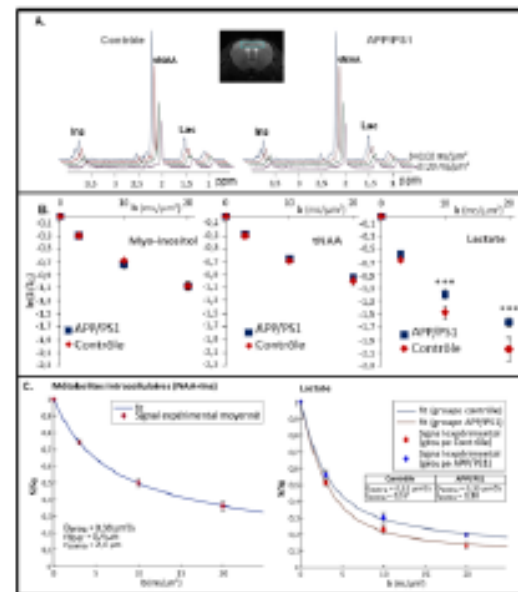
**Résultats :** L'Ins et le NAA présentent des profils d'atténuation de signal similaires dans les deux groupes, mais le signal de Lac est moins atténué chez les APP/PS1 (Student's t-test,  $p < 0.01$ ) (fig1.A-B). Ceci suggère que la microstructure neuronale et astrocytaire reste globalement similaire chez les APP/PS1, et que la diffusion ralentie du Lac peut être due soit à une plus petite fraction de Lac extracellulaire, soit à une diffusion plus lente dans l'ECS due à la présence de plaques amyloïdes. Puisque les signaux du NAA et de l'Ins des deux groupes sont très proches, ils ont été moyennés en un seul signal IC, modélisé avec un modèle de sphères+cylindres<sup>3</sup> afin d'extraire des paramètres moyens de microstructure cellulaire (fig.1.C). Le signal du Lac a ensuite été fitté pour chaque groupe avec un modèle bi-compartimental IC + ECS (supposé Gaussien), tirant partie de la connaissance des paramètres

IC et laissant libre la diffusivité ( $D_{extra}$ ) et la fraction ( $f_{extra}$ ) extracellulaires. Il en résulte une valeur de  $D_{extra}$  similaire, mais une  $f_{extra}$  plus faible chez les APP/PS1.

**Conclusion :** La DW-MRS permet de détecter des variations de diffusion du Lac chez les souris APP/PS1, suggérant une baisse de la fraction extracellulaire de lactate. Compléter les données par des acquisitions en encodage en double diffusion<sup>4</sup> pourrait améliorer la modélisation de la compartimentation du lactate, qui reste encore fragile.

**Références :** [1] Palombo M. et al., Neuroimage, 2018 [2] Mougel E. et al., J Magn Reson, 2022 [3] Malaquin S. and Valette J., Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 2022. [4] Vincent M. et al., Neuroimage, 2020.

**Remerciements :** ERC (n° 818266), NeurATRIS (ANR-11-INBS-0011).



**Figure 1 - A:** Jeux de données pour le groupe contrôle et APP/PS1. **B:** atténuation du signal pour le NAA, l'Ins et le Lac en fonction de b. **C:** Fit des atténuations du signal des métabolites IC (gauche) et du Lac (droite)

## Communication n°6. Investigating changes in brain lactate compartmentation using diffusion-weighted MRS in APP/PS1 mice

**Evènement :** 31<sup>st</sup> ISMRM & SMRT annual meeting & exhibition – 03-08 June 2023, Toronto, Canada

**Organisation :** International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)

Abstract sélectionné pour une présentation poster en format digital

### Abstract :

#### Investigating changes in brain lactate compartmentation using diffusion-weighted MRS in APP/PS1 mice

Sophie Malaquin<sup>1</sup>, Eloïse Mougel<sup>1</sup>, Rodrigo Lerchundi<sup>1</sup>, and Julien Valette<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses, France

#### Synopsis

**Diffusion-weighted MR spectroscopy yields information about the microstructure of the environment where brain metabolites are diffusing. Here, we measure the diffusion of two purely intracellular metabolites (astrocytic myo-inositol and neuronal N-acetyl aspartate) and of lactate, which is also present in the extracellular space, in the cortex of 12-month-old APP/PS1 and control mice. While astrocytic and neuronal microstructures appear unchanged in APP/PS1 mice, lactate diffusion appears slower. Modeling DW-signals suggests decreased extracellular lactate fraction.**

#### Introduction

Diffusion-weighted MR spectroscopy (DW-MRS) allows characterizing metabolite diffusion properties in the brain and may thus yield information about the microstructural environment in which these metabolites are diffusing<sup>1</sup>. Therefore, it can be possible to obtain cell-specific microstructural information by measuring the diffusion of neuron-specific metabolites such as N-acetylaspartate<sup>2</sup> (NAA) and of astrocyte-specific metabolites such as myo-inositol<sup>3</sup> (Ins). Since lactate is present in astrocytes, neurons, and in the extracellular space<sup>4</sup>, its diffusion properties are expected to reflect specific signatures of intra-neuronal, intra-astrocytic, and extracellular diffusion, in proportions directly reflecting the fraction of lactate in each of these compartments.

The goal of this work is to evaluate the ability of DW-MRS to non-invasively capture variations of lactate compartmentation, in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease (which exhibits features such as the accumulation of amyloid plaques in the brain extracellular space<sup>5</sup>, decreased levels of NAA and increased levels of taurine<sup>6</sup> and lactate<sup>7</sup>). We use an optimized DW-MRS sequence with polychromatic refocusing pulses to measure DW-signal attenuation of lactate with increased precision<sup>8</sup>, as well as NAA and Ins diffusion. Data modeling is performed to tentatively explain the origins of potential variations of lactate diffusion.

#### Methods

Six heterozygous APP/PS1 mice and six WT littermates anesthetized with ~1% isoflurane were scanned on an 11.7 T Bruker system with a quadrature surface cryoprobe in a 15  $\mu$ L cortical voxel. DW-MRS measurements were acquired using a home-made polychromatic SE-LASER sequence<sup>8</sup> which consists of a polychromatic echo pulse targeting NAA, myo-inositol, lactate at 1.31 ppm, and macromolecule (MM) at 0.9 ppm, surrounded by a pair of diffusion gradients ( $\delta/\Delta = 3.1/53.2$  ms); followed by a LASER localization block (yielding a total TE of 83.4 ms). Acquisitions were performed at four different diffusion-weighting values ( $b = 0.02, 3.02, 10$  and  $20$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>, TR = 2000 ms, 256 repetitions in total for each  $b$ ). Importantly,  $b$ -values were acquired in an interlaced manner, i.e. the  $b$ -value was changed for each repetition. Furthermore, to avoid bias due to potential diffusion anisotropy in the voxel, powder averaging was performed, i.e. diffusion gradient orientation was modified for each cycle of  $b$ -values to uniformly cover the surface of a sphere.

Spectra were processed with Matlab and analyzed with LCMoel<sup>9</sup>. Note that experimental MM spectra were acquired (using double-inversion-recovery and  $b = 10$  ms/ $\mu$ m<sup>2</sup>) for inclusion in LCMoel basis sets (fig.1).

## Results and discussion

Group-averaged DW-spectra are shown in fig.1A. No difference between groups was observed for MM spectra, so that they were pooled to increase SNR. Lactate peak at 1.31 ppm remains clearly visible even at the largest  $b$ -value, and visually appears to decrease slightly faster in the control group (fig.1B). Averaged signal attenuations are shown in fig.2. Overall, while Ins and NAA signal attenuations remain very close in both groups, lactate signal is significantly less attenuated in APP/PS1 (Student's  $t$ -tests,  $p < 0.01$ ). This suggests that, because astrocytic and neuronal microstructures remain globally unchanged in APP/PS1 mice (i.e., when averaged across the voxel), slower lactate diffusion might be due to either a smaller fraction of extracellular lactate (since diffusion occurs faster in ECS<sup>10</sup>), or to hindered diffusion in the extracellular space due to the presence of amyloid aggregates. Interestingly, the overall lactate concentration as assessed without diffusion-weighting was similar in both groups.

DW-signals of NAA and Ins were modeled to estimate cell microstructure and then predict lactate diffusion in intracellular space, using a sphere+cylinder model<sup>11</sup>. In this work, tNAA and Ins signals in both groups appear too similar to differentiate astrocytic and neuronal diffusion in both groups; therefore we decided to average the four intracellular DW-signals (tNAA and Ins in both groups) to extract some average cell microstructure parameters and average NAA/Ins intracellular diffusivity (fig.3A). DW-signal of lactate was then *fitted* in each group using a two-compartment model (intra and extracellular space), assuming Gaussian diffusion in the extracellular space and letting extracellular fraction  $f_{\text{extra}}$  and extracellular diffusivity  $D_{\text{extra}}$  as free parameters (fig.3B). Modeling yields relatively unaltered  $D_{\text{extra}}$  but quite lower  $f_{\text{extra}}$  in the APP/PS1 group.

Ultimately, lower extracellular lactate fraction might be due either to decreased extracellular volume fraction, or to decreased lactate concentration in the extracellular space. To help decipher which hypothesis is most likely to explain this variation, measurements of lactate concentration in the extracellular space using implanted enzyme-electrodes<sup>12</sup> are currently underway.

## Conclusion

DW-MRS could successfully detect variations of lactate diffusion in a mouse model of neurodegenerative disease (APP/PS1). Modeling suggests that such variations were due to decreased extracellular lactate fraction. While the ultimate cause for such decreased fraction remains to be elucidated, e.g. using invasive reference techniques such as enzyme-electrodes, we believe that enhancing DW-MRS data, e.g. with double diffusion encoding<sup>13</sup>, may provide richer information<sup>14</sup> leading to more robust modeling of lactate compartmentation, which for now remains quite fragile.

## Acknowledgements

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programs (grant agreement n° 818266).

11.7 T scanner was funded by NeurATRIS ("Investissements d'Avenir", ANR-11-INBS-0011).

## References

1. Palombo M, Shemesh N, Ronen I, Valette J. Insights into brain microstructure from in vivo DW-MRS. *Neuroimage*. 2018; 182:97-116.
2. Simmons ML, Frondoza CG, Coyle JT. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience*. 1991; 45(1):37-45.
3. Choi JK, Dedeoglu A, Jenkins BG. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR Biomed*. 2007 (3):216-37.
4. Mächler, P., Wyss, M. T., Elsayed, et al. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism*, 2016, 23(1), 94-102.
5. Garcia-Alloza, M., Robbins, E., Zhang-Nunes, S., et al. Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease, *Neurobiology of Disease*, 2006, 24, 3:516-524.
6. Sabbagh JJ, Kinney JW, Cummings JL. Alzheimer's disease biomarkers in animal models: closing the translational gap. *Am J Neurodegener Dis*. 2013; 2(2):108-20.
7. Newington JT, Harris RA, Cumming RC. Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model. *J Neurodegener Dis*, 2013; 2013:234572.
8. Mougél E, Malaquin S, Vincent M, Valette J. Using spectrally-selective radiofrequency pulses to enhance lactate signal for diffusion-weighted MRS measurements in vivo. *J Magn Reson*. 2022; 334:107113.
9. Provencher, SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*, 1993, 30:672-679

10. Vincent M, Gaudin M, Lucas-Torres C, Wong A, Escartin C, Valette J. Characterizing extracellular diffusion properties using diffusion-weighted MRS of sucrose injected in mouse brain. *NMR Biomed.* 2021;34(4):e4478.

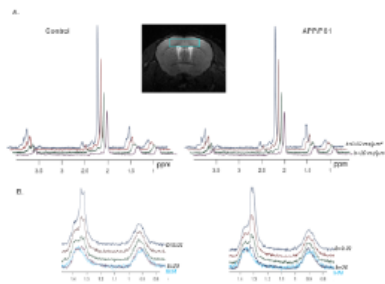
11. Malaquin, S. & Valette, J. How modeling lactate diffusion may inform on its cellular compartmentation? An initial study. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 2022, 30, 1508.

12. Rathee K, Dhull V, Dhull R, Singh S. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochem Biophys Rep.* 2015; 5:35-54.

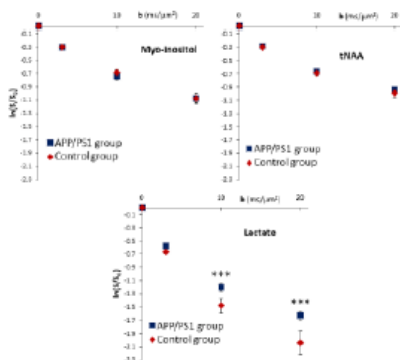
13. Shemesh, N., Özarslan, E., Komlosh, et al. From single-pulsed field gradient to double-pulsed field gradient MR: gleaming new microstructural information and developing new forms of contrast in MRI. *NMR Biomed.* 2010, 23: 757-780.

14. Vincent, M., Palombo, M., & Valette, J. Revisiting double diffusion encoding MRS in the mouse brain at 11.7T: Which microstructural features are we sensitive to? *NeuroImage*, 2020, 207:116399.

**Figures**

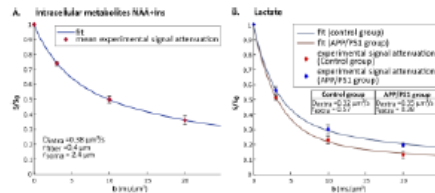


**Figure 1.** **A.** Spectra acquired up to high diffusion-weightings ( $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  to  $b = 20 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ) in the APP/PS1 mouse model with the polychromatic SE-LASER sequence. Spectra were averaged over six mice in each group (left) to increase the signal-to-noise ratio for visualization in this figure. **B.** Stackplot of spectra zoomed around the lactate peak. Compared to the control group, lactate signal seems to remain slightly larger at high  $b$  values in the APP/PS1 group. Macromolecule spectra are superimposed on the spectra at the highest  $b$ -value to better assess lactate signal.





**Figure 2.** Signal attenuation as a function of diffusion-weighting  $b$  for tNAA, myo-inositol, and lactate, in both groups (red diamond = control group, blue square = APP/PS1 group). Data points and error bars stand for mean  $\pm$ s.d. ( $n = 6$  animals per group). Lactate exhibits significantly different diffusion attenuation (ANOVA,  $p < 0.001$ ). Unpaired Student's t-tests were run as post hoc tests for each  $b$  value to assess significantly different data points between groups (\*\*\*:  $p < 0.001$ , after Bonferroni correction).



**Figure 3. A.** Fit of DW-signal attenuation averaged for Ins and tNAA and for both groups, using a two-compartment sphere+cylinder model. **B.** Fit of lactate DW-signal attenuation for each group, using a two-compartment cylinder model incorporating prior knowledge about sphere+cylinder parameters from Ins and NAA diffusion as determined previously, and letting lactate extracellular diffusivity  $D_{extra}$  and extracellular fraction  $f_{extra}$  as free parameters. It appears that  $f_{extra}$  decreases by  $\sim 30\%$  in APP/PS1 mice, while  $D_{extra}$  seems relatively unchanged.



# Using spectrally-selective radiofrequency pulses to enhance lactate signal for diffusion-weighted MRS measurements in vivo



Eloïse Mougel, Sophie Malaquin, Mélissa Vincent, Julien Valette\*

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, MIRCen, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (UMR 9199), Fontenay-aux-Roses, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 June 2021

Revised 2 November 2021

Accepted 23 November 2021

Available online 26 November 2021

### Keywords:

DW-MRS

J-coupling

Frequency selective pulse

Polychromatic pulse

Lactate

## ABSTRACT

Measurement of lactate diffusion properties using diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo may allow elucidating brain lactate cellular compartmentation, which would be of great importance for neuroscience. However, measuring lactate signal is complicated by low signal-to-noise ratio due to low lactate concentration and J-modulation of its 1.3 ppm peak.

In this work, we assess the benefits of using a diffusion-weighting spin echo block and spectrally selective refocusing pulses to suppress the effect of J-coupling on the 1.3 ppm lactate resonance, by not refocusing its coupling partner at 4.1 ppm. Two different kinds of spectrally selective pulses, either polychromatic or single-band, are evaluated in the mouse brain at 11.7 T. Almost complete suppression of J-modulation is shown, resulting in an approximately two-fold signal increase as compared to a reference STE-LASER sequence (for the specific diffusion times used in this work). Repeated measurements confirm that lactate diffusion-weighted signal attenuation is measured with an approximately two-fold precision.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The idea has been proposed that measuring brain lactate (Lac) diffusion properties, using diffusion-weighted MR spectroscopy (DW-MRS), may shed some light about lactate distribution between extracellular and intracellular space, due to different diffusion properties within these two compartments [1]. More recently, it has been suggested that morphological differences between astrocytes and neurons are large enough to induce different intracellular diffusion properties, as assessed by measuring the diffusion of cell-specific metabolites such as astrocytic myoinositol (Ins) and neuronal N-acetyl aspartate (NAA) [2–4], so that DW-MRS might even allow distinguishing astrocytic lactate from neuronal lactate [5]. This opens fantastic perspectives to non-invasively study the cellular compartmentation of brain lactate, which is tightly linked to the controversial astrocyte-to-neuron lactate shuttle hypothesis [6], whereby the existence of a lactate concentration gradient, as recently confirmed using FRET imaging [7], allows lactate produced in excess in astrocytes to be released in the extracellular space and taken up by neurons to sustain (at least partially) neuronal energy needs.

Measuring brain lactate diffusion properties with DW-MRS is however critically limited by the low signal-to-noise ratio (SNR), due to low lactate concentration (0.5–1 mM) and, on top of that, to the fact that its prominent  $\text{CH}_3$  peak at 1.3 ppm is J-coupled with the CH group (resonating at 4.1 ppm and barely detectable on spectra). Hence, DW-MRS sequence must be carefully chosen to maximize lactate signal. Methods have been proposed to optimize detection of the 1.3-ppm lactate peak and separate it from macromolecules at 1.2–1.4 ppm, based on comparison/difference of spectra acquired at different echo times (TE) [8], or on MEscherGARwood (MEGA) J-editing [9]. However these methods require very long TE (>144 ms), which becomes impractical at high field because of shorter T2 relaxation times [10]. Moreover, these methods require at least two acquisitions which are then subtracted, which may lead to artifacts. Finally, incorporating diffusion gradients in such sequences is not trivial if one wants to avoid cross-terms with other gradients.

In most of our recent works, including in Ligneul *et al.* [5] where lactate signal at high *b*-values was interpreted as reflecting lactate compartmentalized primarily within astrocytes in control mice, but primarily within neurons in a mouse model of astrocyte reactivity, we used the STE-LASER sequence [11]. This sequence consists of a non-localized diffusion-weighted stimulated echo (STE) block, followed by a LASER localization block. The advantage of STE-based diffusion-weighting is that it allows high *b*-values

\* Corresponding author.

E-mail address: [julien.valette@cea.fr](mailto:julien.valette@cea.fr) (J. Valette).

(or long diffusion time  $t_d$ ) to be reached, while keeping TE relatively short and, thus, mitigating J-modulation (and  $T_2$  relaxation). Hence, while STE results in the loss of half the magnetization as compared to a spin echo (SE), in general there is no benefit to perform SE-based diffusion-weighting, at least for J-coupled metabolites such as lactate.

In a weakly coupled spin system evolving during a spin echo, J-coupling effect on any resonance can be canceled by refocusing only that particular resonance. In the context of lactate diffusion measurement with STE-LASER, replacing the STE diffusion block by a SE diffusion block, where the refocusing pulses selectively refocuses the 1.3 ppm, but not the 4.1 ppm resonance, will cancel the effect of J-coupling. The goal of this work was to assess to what extent such an approach allows better characterization of lactate signal attenuation, for diffusion times of  $\sim 50$  ms (i.e. similar to the one which allowed observing very significant alteration of lactate signal attenuation in a mouse model of astrocyte reactivity [5]). Besides the constraint on refocusing the lactate resonance at 1.3 ppm, but not at 4.1 ppm, we imposed the two following specifications:

- In the long-term perspective of comparing lactate diffusion to cell-specific intracellular metabolites to elucidate lactate compartmentation, the pulse must also refocus the NAA at 2 ppm and the Ins at 3.5 ppm, so that these peaks are visible on spectra.
- Since macromolecules (MM) at 1.4 ppm largely overlap with lactate, it is necessary to properly quantify MM signal. Hence we propose to refocus the isolated 0.9-ppm MM peak, in order to provide a reliable estimate of overall MM contribution.

Two different kinds of spectrally-selective refocusing pulses were evaluated: either a polychromatic (PC) pulse with several bands refocusing only the resonances of interest (as previously used by Shemesh et al. [4,12]), or a single-band (SB) pulse refocusing the whole  $\sim 0.1$ – $4.0$  ppm range.

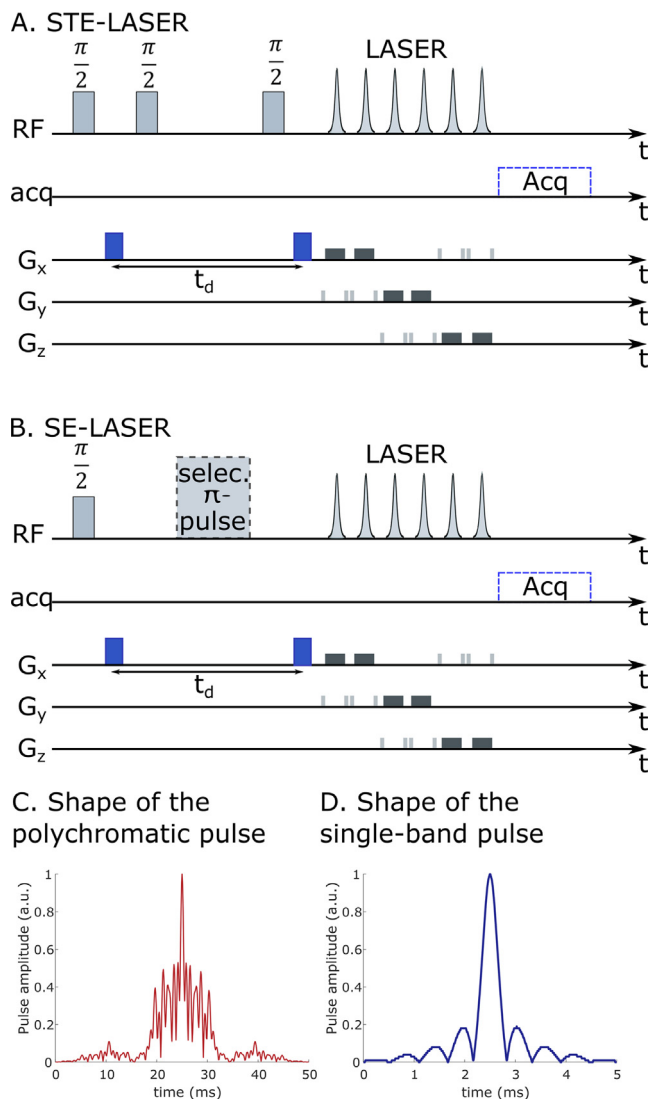
## 2. Methods

Two series of independent experiments were conducted to evaluate the precision on lactate signal attenuation measurement: first, diffusion measurements using standard STE-LASER sequence (Fig. 1A), used as a reference, were compared to a “PC-SE-LASER” sequence, i.e. a sequence where the diffusion-weighted STE block is replaced by a diffusion-weighted SE block where refocusing is achieved with a polychromatic pulse (Fig. 1B and 1C); second, diffusion measurements using standard STE-LASER sequence were compared to SB-SE-LASER, i.e. a SE-LASER sequence where refocusing is now achieved with a single-band (0.1–4.0 ppm range) refocusing pulse (Fig. 1B and 1D).

### 2.1. Sequences design

The STE-LASER used as reference is as described in the original article [11], where the STE block consists in three broad pulses and diffusion gradients, and the LASER block contains six adiabatic full passage (HS1) slice-selective pulses (Fig. 1A).

For the SE block in SE-LASER sequences (Fig. 1B), excitation is achieved by an adiabatic half passage pulse, and refocusing is performed by a selective pulse consisting either in the polychromatic (Fig. 1C) or the single-band pulse (Fig. 1D). Diffusion gradients are positioned symmetrically around the refocusing pulse. The LASER block is the same as in the STE-LASER, with a 25-ms duration in all cases.



**Fig. 1.** Chronograms of A) STE-LASER used as reference, and B) SE-LASER where selective refocusing is performed in the SE block. Two selective radiofrequency (RF) pulses were generated with the Shinnar-Leroux algorithm: C) polychromatic RF pulse that is selective on four bands of interest, and D) selective single-band RF pulse on the 0.1–4.0 ppm range. Diffusion gradients are indicated in blue. The slice selection gradients and the spoiler gradients are in dark gray and light gray, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 2.2. Generation of RF pulses

The polychromatic pulse was generated by summing four elementary pulses (complex summation) modulated at four different frequency offsets: 3.5 ppm (Ins), 2 ppm (NAA), 1.3 ppm (Lac) and 0.9 ppm (MM). The elementary pulse was generated using the Shinnar-Leroux (SLR) algorithm [13], with Pauly’s tool implemented in Matlab (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Time  $\times$  bandwidth product was set to 3.9 and pulse duration was then set to 50 ms, resulting in an elementary pulse bandwidth of 78 Hz. Target in-phase ripple amplitude was 0.1% and target out-phase ripple amplitude was 0.01%.

The single-band pulse refocusing the 0.1–4.0 ppm band was also generated with the SLR algorithm. Time-bandwidth product was set to 8.3, and ripple amplitudes were set to 0.1% and 0.45% for in-phase and out-phase, respectively. Pulse duration was set to 5 ms, resulting in 1660-Hz bandwidth. A 1300-Hz offset was applied to center the pulse at the middle of the 0.1–4.0 ppm band.

2.3. Evaluating pulse performance with numerical simulations

Pulse performance was evaluated with a homemade Bloch simulator implemented in Matlab. Simulations were performed for isochromats from -1.3 to 6.7 ppm, and for B<sub>1</sub> intensities from 0.05 to 10.15 μT for the PC case, and from 0.05 to 60.55 μT for the SB case. To facilitate visualization of results, simulations were performed for an inversion, i.e. for magnetization originally along B<sub>0</sub> (+z).

Then, metabolite spectra were simulated for both SE-LASER sequences, using home-made Matlab routines to compute the evolution of the density matrix, with chemical shifts and J-coupling constants as reported in [14]. This allows the efficiency of J-coupling suppression on lactate to be evaluated, and to simulate the basis-set for quantification of in vivo spectra (see below).

2.4. In vivo experiment

All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44), and authorized by the French Ministry of Education and Research. They were performed in an approved facility (authorization #B92-032-02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010-63/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering, and animal care was supervised by veterinarians and animal technicians. Mice were housed under standard environmental conditions

(12-hour light-dark cycle, temperature: 22 ± 1 °C and humidity: 50%) with ad libitum access to food and water.

Experiments were performed on an 11.7 T BioSpec Bruker scanner interfaced to PV6.0.1 (Bruker, Ettlingen, Germany). A quadrature surface cryoprobe (Bruker, Ettlingen, Germany) was used for transmission and reception. Two 3-month-old C56-BL7 mice were anesthetized with ~1.5% isoflurane and maintained on a stereotaxic bed with a bite and two ear bars. Throughout the experiments, body temperature was monitored and maintained at ~36 °C by warm water circulation. Breathing frequency was monitored using PC - SAM software (Small Animal Instruments, Inc., Stony Brook, NY).

A 31.5 μL (7 × 1.5 × 3 mm<sup>3</sup>) spectroscopic voxel was placed around the hippocampus, and shimming was performed using Bruker's Mapshim routine, yielding a water linewidth of ~16 Hz. 8 series of 32 repetitions were acquired for two different b-values (b = 0.02 ms/μm<sup>2</sup>, which is the minimal b-value allowing efficient spoiling of unwanted coherences, and 8 ms/μm<sup>2</sup>) with the PC-SE-LASER in the first experiment (Fig. 2A) and SB-SE-LASER in the second experiment (Fig. 2B), and in both experiments with the STE-LASER as reference. Each series of acquisitions was interleaved according to the pattern in Fig. 2C, to mitigate potential biases arising over the course of the experiment (such as degraded shim or variations of lactate concentration). For STE-LASER acquisitions, water suppression was achieved using a VAPOR module plus an additional water suppression pulse inserted in the mixing time

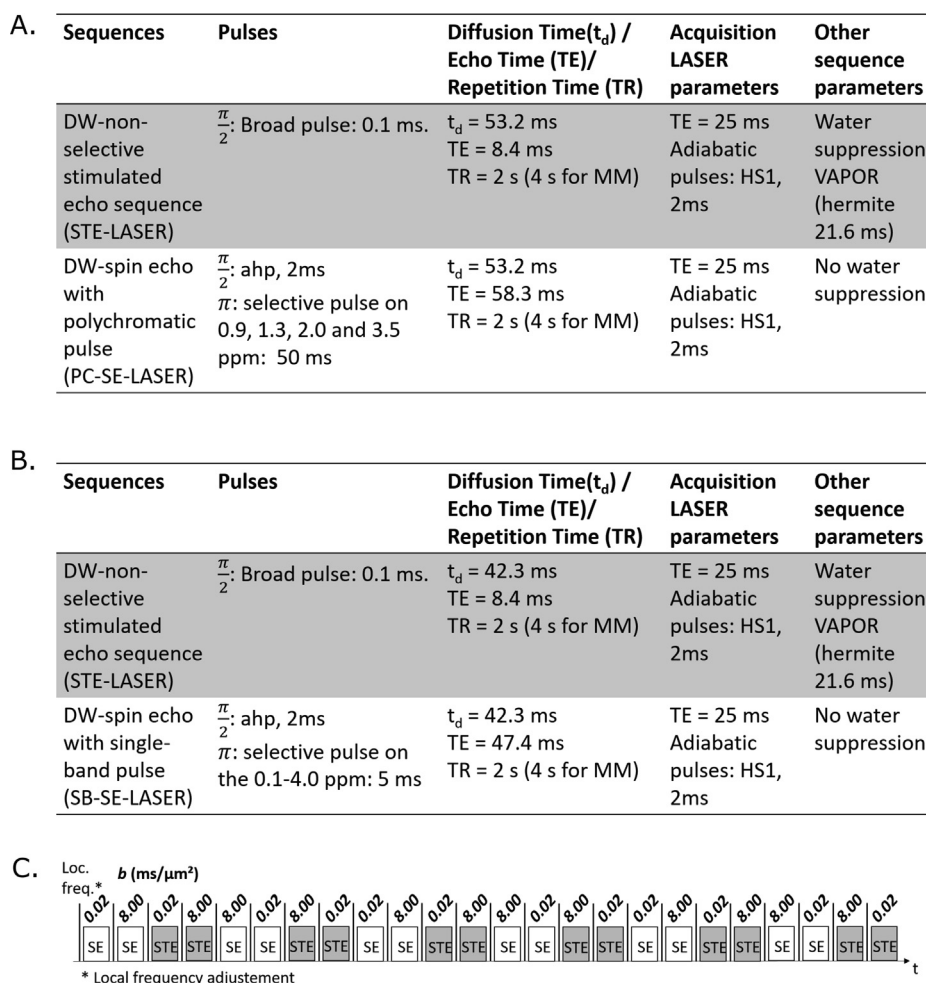
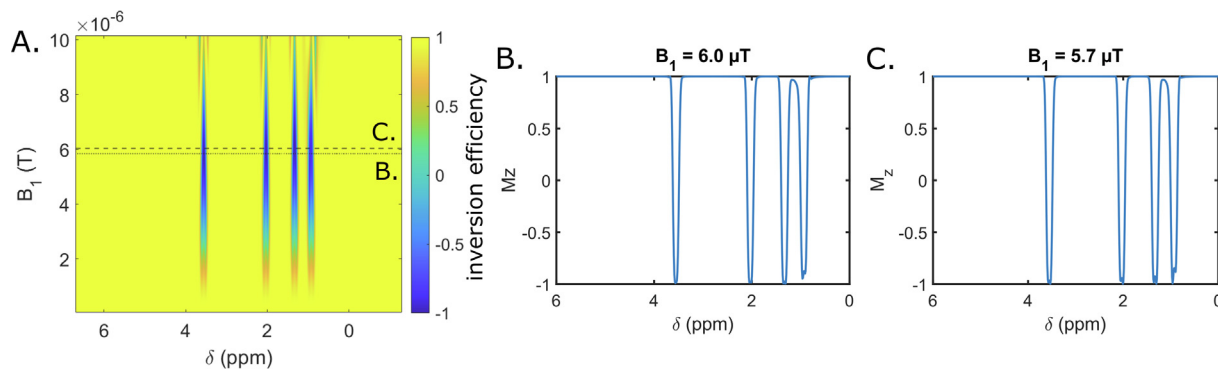


Fig. 2. Sequence parameters in both experiments. A) Comparisons between STE-LASER and PC-SE-LASER. B) Comparisons between STE-LASER and SB-SE-LASER. C) Diagram showing how acquisition blocks (32 repetitions each) are interleaved.



**Fig. 3.** A) Polychromatic pulse performance evaluated with Bloch simulations as a function of chemical shift  $\delta$  and  $B_1$ ; Frequency profiles for B)  $B_1 = 6.0 \mu\text{T}$  and for C)  $B_1 = 5.7 \mu\text{T}$ .

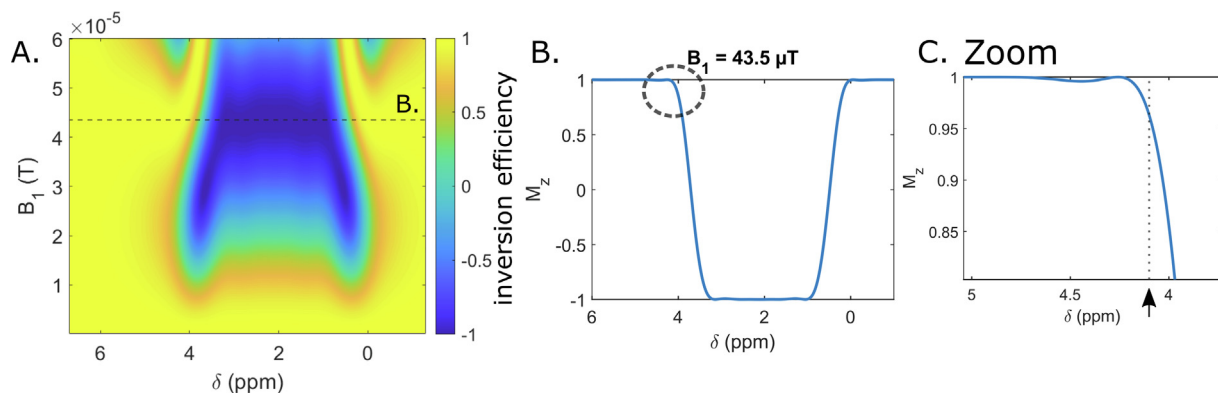
(not shown in Fig. 1A). In contrast, for both SE-LASER sequences, no water suppression was required, as water signal is not refocused in the SE block. Finally, MM spectrum (256 averages) was acquired for all sequences using a double inversion recovery module ( $T_{I1} = 2200 \text{ ms}$  and  $T_{I2} = 770 \text{ ms}$ ), at  $b = 10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  for further metabolite suppression.

Note that the minimal diffusion time  $t_d$  which can be achieved with the STE-LASER sequence is 42.3 ms, due to the water suppression pulse during mixing time. Hence, for the SB-SE-LASER versus STE-LASER comparison,  $t_d = 42.3 \text{ ms}$  was used for both sequences

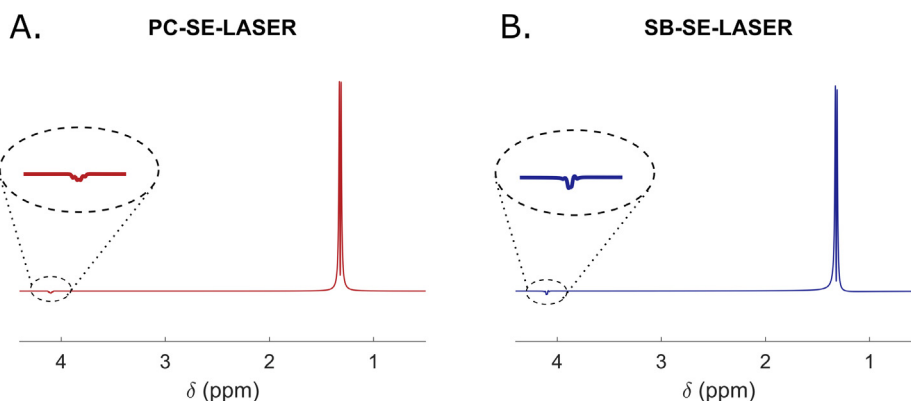
(Fig. 2B). However, in the PC-SE-LASER, the 50-ms polychromatic pulse imposes a minimal  $t_d$  of 53.2 ms, which was used for both sequences for the PC-SE-LASER versus STE-LASER comparison (Fig. 2A).

2.5. Spectra analysis

Individual scans were phase- and frequency-corrected by home-made routines, before summation [15]. Then, spectra were



**Fig. 4.** A) Single-band pulse performance evaluated with Bloch simulations as a function of chemical shift  $\delta$  and  $B_1$ . B) Frequency profile for the optimal  $B_1 = 43.5 \mu\text{T}$ . C) Zoom on the profile's "foot", showing very moderate (but not null) effect at 4.1 ppm (arrow), where lactate CH resonates.



**Fig. 5.** Simulated lactate spectrum obtained with SE-LASER sequence using A) the polychromatic pulse or B) the single-band pulse. Total TE is 83.3 ms in the PC case (58.3 ms for the SE part and 25 ms for the LASER part), and 72.4 ms for the SB case (47.4 ms for the SE part and 25 ms for the LASER part). J-modulation is greatly suppressed on the 1.3 ppm resonance in both cases, but slightly less for the SB pulse, which may possibly be ascribed to the slightly larger residual signal refocused at 4.1 ppm. Spectra are shown with the same vertical scaling. A 15-Hz line broadening was applied to mimick in vivo conditions.

quantified using LCModel [16], with basis-sets including simulated metabolite spectra and experimental MM spectra.

### 3. Results

#### 3.1. Simulations

The simulated profile of the polychromatic pulse barely changes when  $B_1$  varies close to the optimal value of  $\sim 6.0 \mu\text{T}$  (Fig. 3). The bandwidth of each band is  $0.14 \text{ ppm} \pm 0.01 \text{ ppm}$  on average on the four bands, i.e. 70 Hz compared to the expected 78 Hz, i.e. a relative deviation of  $\sim 10\%$ , related to the spectral resolution of the simulation.

Bloch simulations for the single-band pulse (Fig. 4) shows that the optimal  $B_1$  is  $43.5 \mu\text{T}$ . For this  $B_1$ , refocusing occurs on a 0.1–4.0 ppm band, as expected (Fig. 4B). Transition width is quite large ( $\sim 0.9 \text{ ppm}$ ), so that the 4.1 ppm region (where the lactate CH group resonates) is not fully outside the transition band (Fig. 4C).

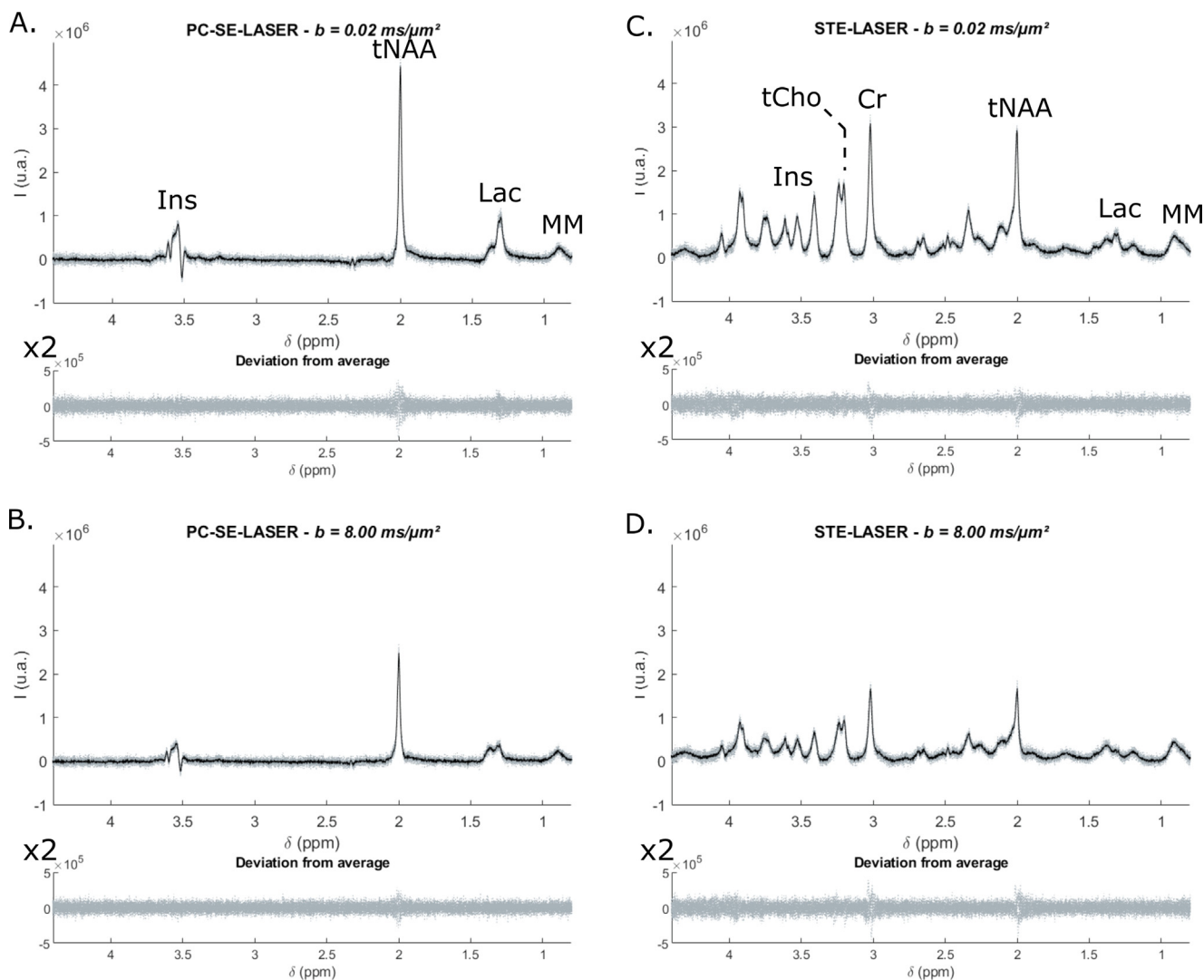
Lactate spectra simulated for the SE-LASER sequences using either the polychromatic or the single-band pulse are shown in Fig. 5, demonstrating the suppression of J-modulation. Due to the fact that the lactate peak at 4.1 ppm is slightly refocused ( $\sim 7\%$  of

the signal at 4.1 ppm actually remains), suppression of J-modulation with the SB pulse is less perfect than with the PC pulse, but still largely efficient. Note that J-modulation during the LASER block is negligible, because that block behaves like a CPMG sequence with short echo spacing compared to J-modulation [17].

#### 3.2. PC-SE-LASER vs. STE-LASER in vivo

In Fig. 6A-B, the selectivity of the polychromatic pulse on the 3 metabolites (Ins, tNAA = NAA + N-Acetylaspartylglutamate (NAAG), and Lac) and MM, as well as overall spectral quality, can be assessed at both  $b$ -values. The 1.3-ppm lactate peak is clearly more intense (by approximately a factor 2) with the PC-SE-LASER than with the STE-LASER.

tNAA peak is also more intense (approximately + 60% when comparing peak amplitude at 2.0 ppm) with the PC-SE-LASER than with the STE-LASER. The inositol peak at 3.5 ppm is fairly distorted, nevertheless its intensity is quite similar for both sequences. Finally, the MM signal at 0.9 ppm is slightly lower with the selective SE than with the STE, which is not surprising considering MM's short  $T_2$ .



**Fig. 6.** In vivo acquisitions for A) the PC-SE-LASER at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; B) the PC-SE-LASER at  $b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; C) the STE-LASER at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; and D) the STE-LASER at  $b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . In order to illustrate spectral stability throughout the experiment, in each panel, the eight spectra (32 averages each) are plotted in gray, while the average spectrum is plotted in black. Deviation of each of the eight spectrum from mean spectrum is plotted in the bottom graph.

LCModel analysis is of reasonable quality (Fig. 7), although some residual signal around Ins peaks seems not accounted for when using the PC-SE-LASER. This could be due to a poor estimation of the Ins signal with the PC-SE-LASER, due to imperfect Ins spectrum in LCModel's basis-set. Nevertheless, Lactate signal appears to be doubled with PC-SE-LASER. Quantification reliability as estimated by LCModel is given by Cramer-Rào lower bounds (CRLBs), as reported in Fig. 8: lactate quantification appears more reliable when using PC-SE-LASER, especially at high  $b$  where CRLB is  $\sim 4\%$  with the PC-SE-LASER versus  $\sim 10\%$  for the STE-LASER; for tNAA there is only a moderate benefit, at high  $b$ ; and for Ins and MM quantification seems slightly degraded but CRLBs remain within acceptable limits ( $<5\%$ ).

Assessing the benefits of using PC-SE-LASER for diffusion measurements might also be done by comparing the coefficient of variation (COV) of signal attenuation  $S(b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2)/S(b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2)$ , calculated over the eight series (Fig. 9B). It appears that COV of signal attenuation is indeed significantly lower for lactate with the PC-SE-LASER (COV  $\sim 2\%$  vs  $\sim 6\%$  for the STE-LASER, with a 95% confidence level as assessed by one-way Fisher test). No

statistically significant difference is found for other metabolites. Moreover, the mean value of the attenuation remains almost the same with both methods, for all metabolites (Fig. 9A).

### 3.3. SB-SE-LASER vs. STE-LASER in vivo

With the single-band pulse, all metabolites in the 0.1–4.0 ppm range are visible (Fig. 10). Lactate signal is again approximately twice larger than with STE-LASER. Total NAA (tNAA = NAA + NAA G), total creatine (tCr = Creatine Cr + Phosphocreatine PCr) and choline compounds (tCho = Choline + Phosphocholine PCho + Glycerophosphorylcholine GPC) are also clearly increased (approximately 80%). In contrast, Ins overall amplitude seems rather unchanged, which might be due to the combined effect of J-coupling,  $T_2$  relaxation and the fact that Ins falls on the edge of the SB pulse frequency profile all counterbalancing the potential benefit of doubling observable magnetization thanks to SE compared to STE. MM signal at 0.9 ppm is much weaker with SB-SE-LASER than with STE-LASER.

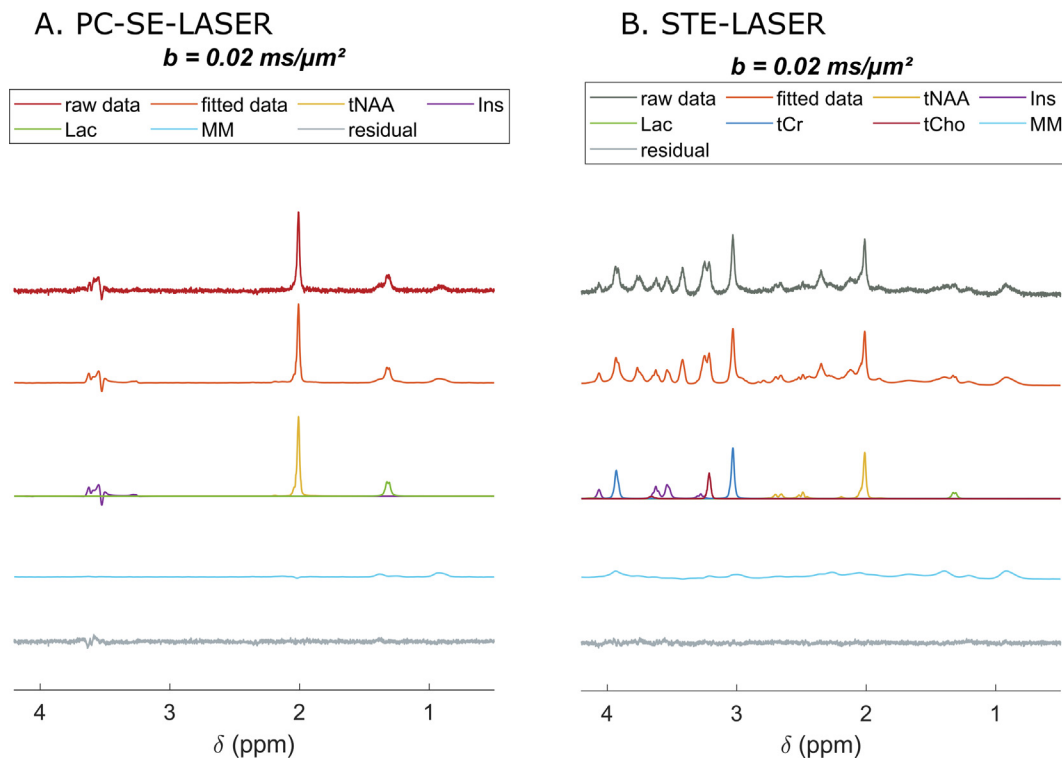


Fig. 7. Example of LCModel analysis for acquisitions performed at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  with A) PC-SE-LASER and B) STE-LASER. Spectra are displayed with the same vertical scale.

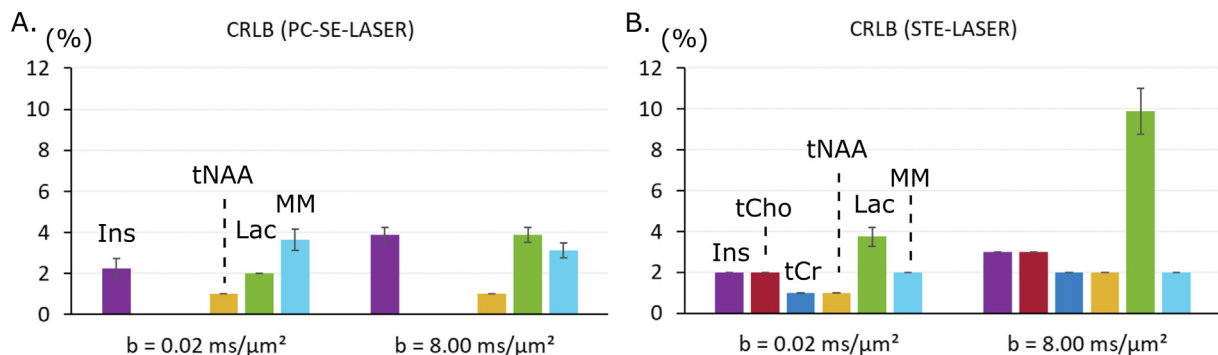
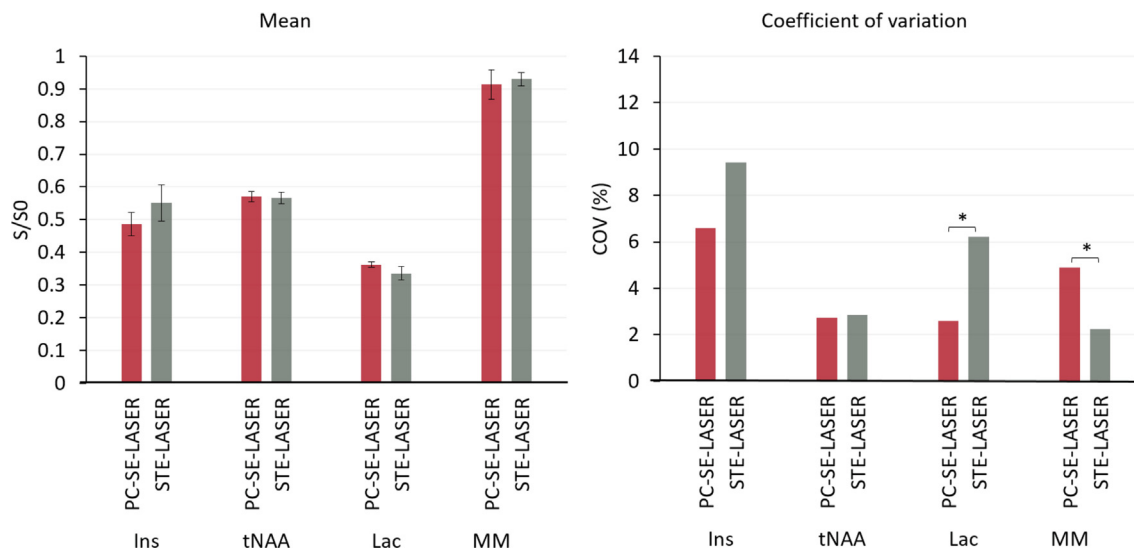
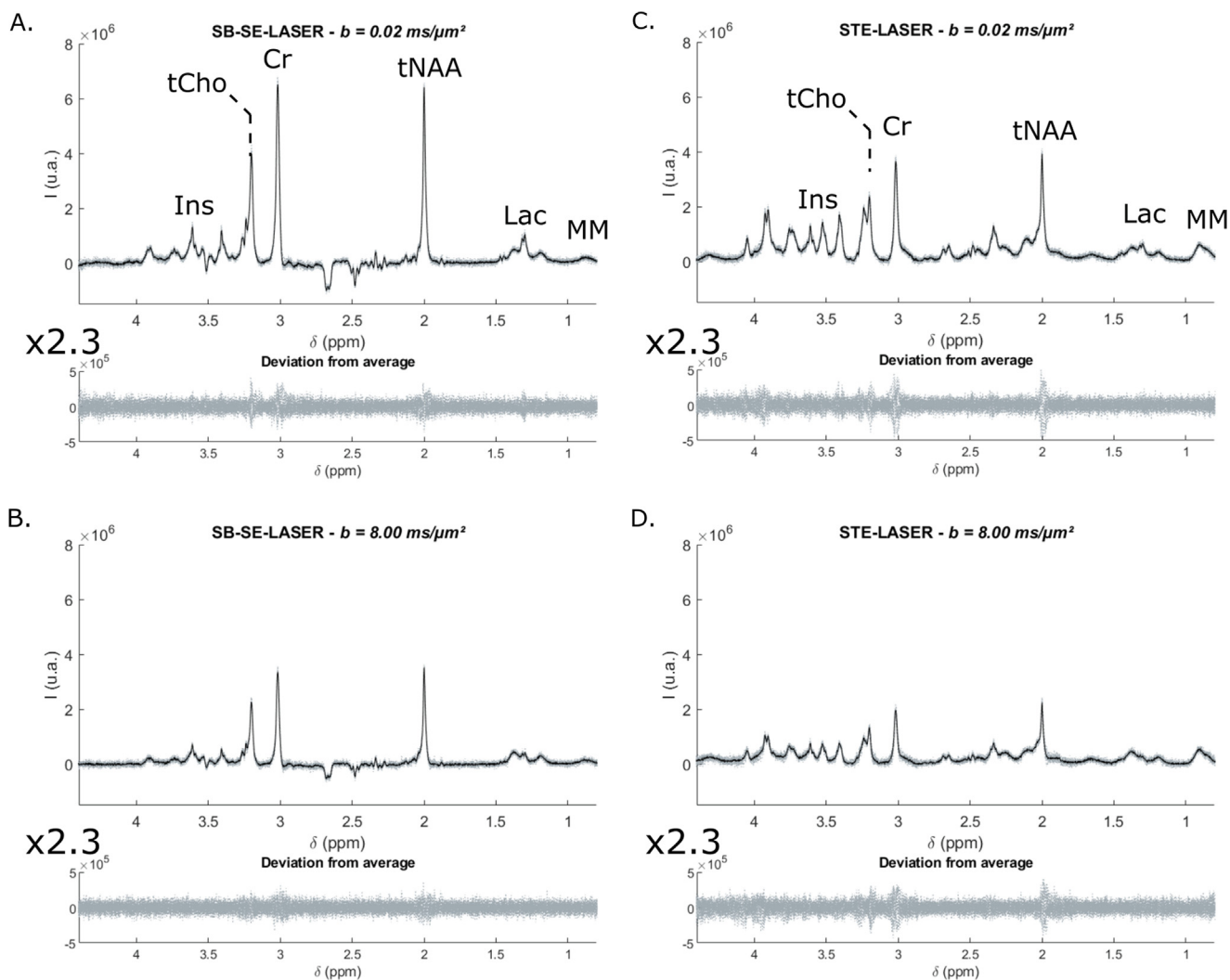


Fig. 8. LCModel's Cramer-Rào lower bounds (mean and s.d. computed over the eight series) for metabolites measured with A) PC-SE-LASER and B) STE-LASER.



**Fig. 9.** A) Mean and standard deviation of signal attenuation  $S/S_0 = S(b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2)/S(b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2)$  and B) coefficient of variation (COV) of signal attenuation on the eight series of acquisition, with PC-SE-LASER (in red) and STE-LASER (in gray). For lactate, COV is indeed lower (with a 95% significance, one-way Fisher test) with PC-SE-LASER than with STE-LASER. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 10.** *In vivo* acquisitions for A) the SB-SE-LASER at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; B) the SB-SE-LASER at  $b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; C) the STE-LASER at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ; and D) the STE-LASER at  $b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ . In order to illustrate spectral stability throughout the experiment, in each panel, the eight spectra (32 averages each) are plotted in gray, while the average spectrum is plotted in black. Deviation of each of the eight spectrum from mean spectrum is plotted in the bottom graph.



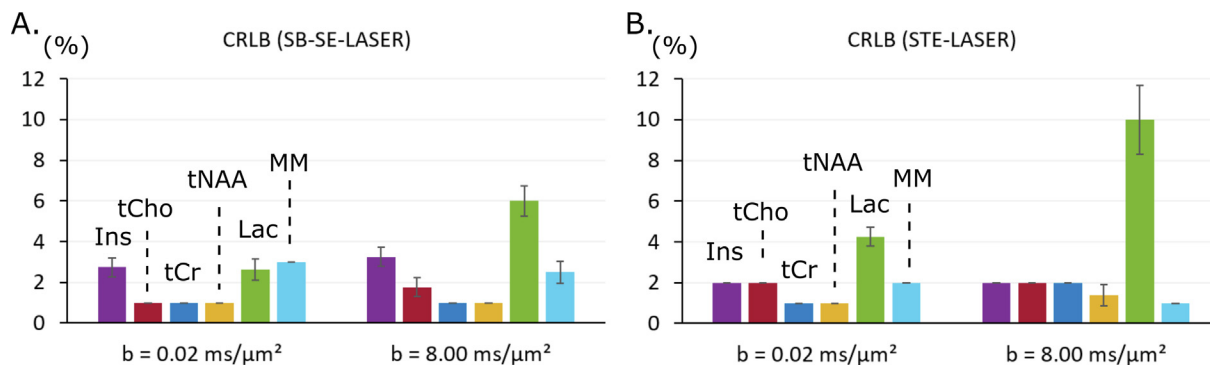


Fig. 11. LCMoel’s Cramer-Rao lower bounds (mean and s.d. computed over the eight series) for metabolites measured with A) SB-SE-LASER and B) STE-LASER.

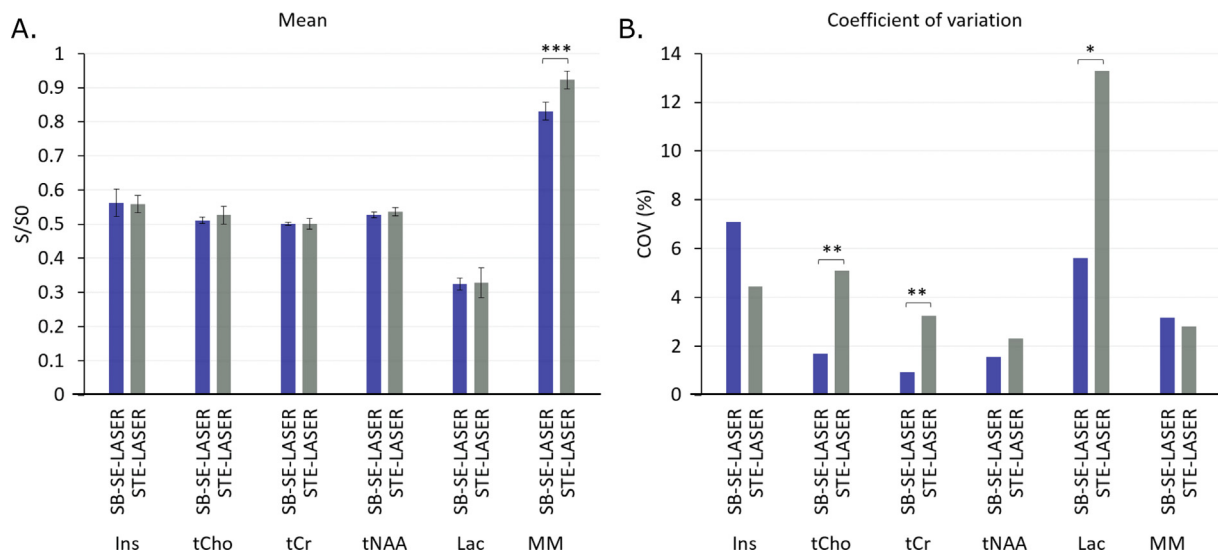


Fig. 12. A) Mean and standard deviation of signal attenuation  $S/S_0 = S(b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2)/S(b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2)$  and B) coefficient of variation (COV) of signal attenuation on the eight series of acquisition, with SB-SE-LASER (in blue) and the STE-LASER (in gray). COV is lower with SB-SE-LASER for lactate (95% significance, one-way Fisher test) and for tCho and tCr (99% significance). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

When looking at LCMoel’s CRLBs (Fig. 11), estimated precisions on metabolite signal is similar with both sequences for tNAA, tCr and tCho, at low  $b$ -value. At higher  $b$ -value, CRLBs are lower with the SB-SE-LASER for tNAA and tCr, but identical for tCho. Ins and MM estimations seems to be slightly less precise with the SB-SE-LASER. Here again, CLRB on lactate appears smaller with the SB-SE-LASER ( $\sim 3\%$  at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  and  $6\%$  at  $b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , versus  $\sim 4\%$  at  $b = 0.02 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  and  $10\%$  at  $b = 8 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  with STE-LASER).

Finally, COV of signal attenuation is significantly lower with SB-SE-LASER for tCho, tCr and Lac (Fig. 12B), but tends to be larger (although not significantly) for Ins and MM, which is overall in line with peak heights and CRLB as reported above. No significant variation of mean attenuation is observed (except for MM). This confirms higher precision of lactate measurement with SB-SE-LASER.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Going from STE to SE: Expected signal gains for singlets

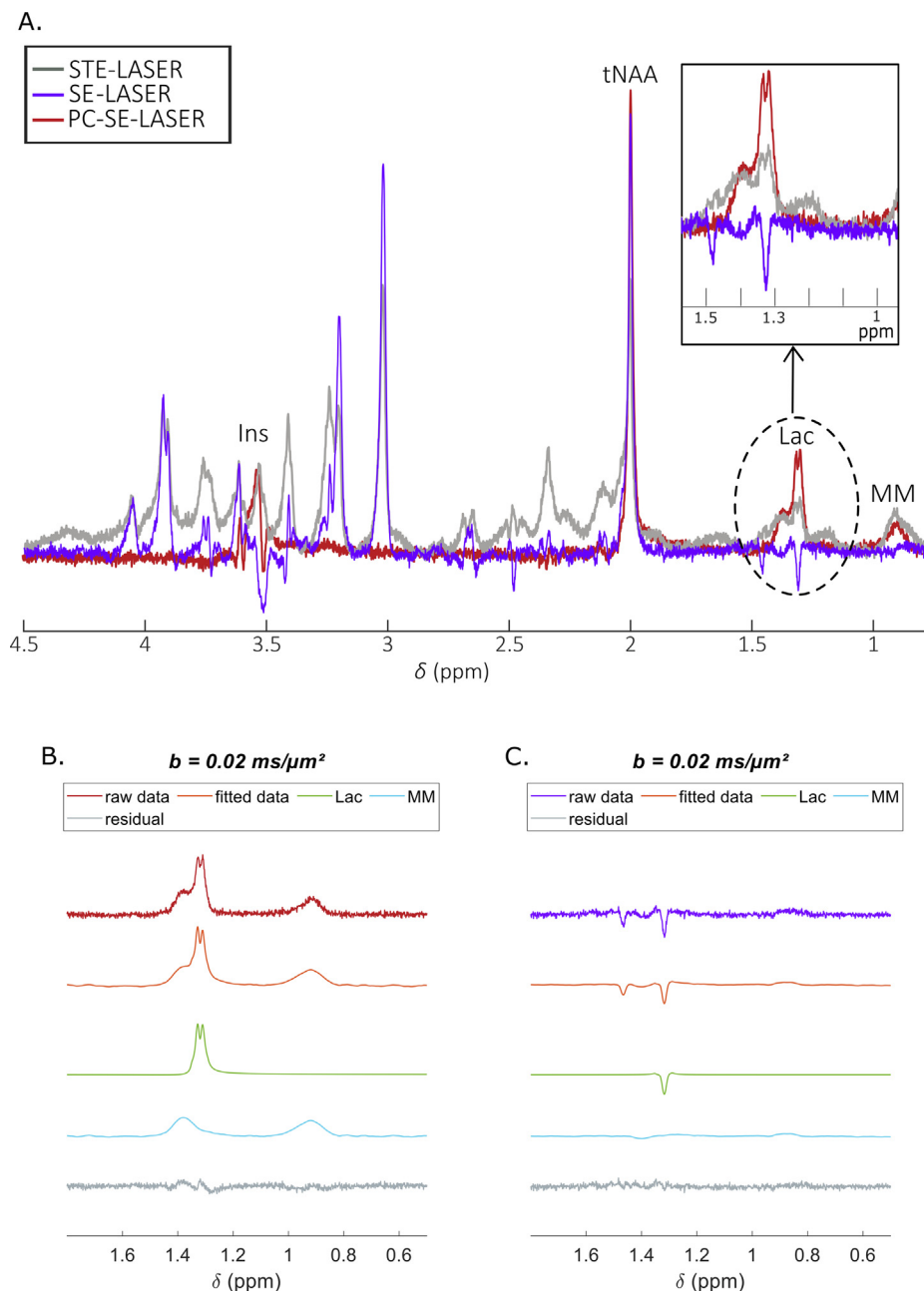
For a singlet such as the  $\text{CH}_3$  group of NAA, going from STE to SE is expected to result in a maximal 2-fold signal gain. However, for a given diffusion time, signal gain will be lower than that because of relaxation. For the SE-LASER, we will make the approximation  $t_d = -TE$  (the echo time in the SE block, without the LASER block), so that signal is given by  $S_{SE} \sim S_0 \times \exp(-t_d/T_2)$ ; for the STE-LASER we will

use the approximation  $t_d = TM$ , and we will neglect  $T_2$  relaxation during the short TE of the STE block (8.4 ms), i.e.  $S_{STE} = S_0/2 \times \exp(-t_d/T_1)$ .  $T_2$  relaxation during the LASER module is not considered, as it is the same in both sequences. Considering  $T_2 \sim 280 \text{ ms}$  and  $T_1 \sim 1710 \text{ ms}$  [10] for NAA at 11.7 T, we hence expect between 70 and 80% signal gain for  $t_d$  as used in this study, which is actually in rather good agreement with the 60% and 75% signal gains observed for tNAA at both  $t_d$  used in this study. The slightly lower gain as compared to theory might be due to imperfect refocusing in the SE block, due to  $B_1$  inhomogeneities.

Using the simplified expressions for  $S_{SE}$  and  $S_{STE}$  as given above, one can also predict that SE-LASER is expected to outperform STE-LASER for singlet detection as long as  $t_d$  is shorter than 200–250 ms. For longer  $t_d$ , STE-LASER should be preferred even for peaks unaffected by J-coupling.

##### 4.2. Simply going from STE to SE does not improve lactate signal, but J-modulation suppression does

When refocusing in the SE block is achieved with a spectrally-selective pulse excluding lactate CH group at 4.1 ppm, increased lactate signal at 1.3 ppm is obtained as compared to STE-LASER sequence. Importantly, this signal increase is not simply due to larger magnetization available in SE as compared to STE, as would be the case for a singlet (see section 4.1 above). This can be demonstrated by replacing the spectrally-selective refocusing pulse by a



**Fig. 13.** Illustration of the benefit of using a spectrally-selective refocusing pulse. A) A spectrum acquired with a STE-LASER sequence (gray) is overlaid with a spectrum acquired with a PC-SE-LASER sequence (red). Increased lactate signal at 1.3 ppm can be clearly appreciated, despite the much increased TE in the PC-SE-LASER (83.3 ms vs 33.4 ms for the STE-LASER). Such signal increase cannot be simply attributed to larger magnetization available with SE, as can be easily assessed by replacing the PC pulse by a broad pulse in the SE-LASER sequence (purple). B)-C) On spectral decompositions extracted from LCMODEL analysis, lactate signal (green) is clearly more intense with the PC-SE-LASER (B) than with the SE-LASER (C), and the MM signal (light blue) is lower with the SE-LASER (the scales are identical on B and C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

broad pulse in the SE block, e.g. as illustrated in Fig. 13A for PC pulse versus broad pulse. LCMODEL decompositions provide a closer look at the actual gain for lactate, once MM contribution has been removed (Fig. 13B and C), confirming a much larger lactate signal in the PC case. Intriguingly, in this comparison MM signal at 0.9 and 1.3 ppm appears more prominent with the polychromatic than with the broad pulse. This might be due to some J-coupling between these MM peaks and some other MM resonances, which would be at least partially cancelled with the PC-SE-LASER.

In the end, we estimate that lactate signal is increased by a factor  $\sim 2$  for the PC-SE-LASER versus STE-LASER, and  $\sim 1.9$  for the SB-SE-LASER versus STE-LASER, as estimated by measuring the peak height after removing MM signal (while peak height can be

affected by linewidth, here the linewidth does not change, due to the interlaced acquisitions). The small difference in gain observed between the two pulses is certainly due to the fact that SB pulse is not as selective as the PC and refocuses slightly more the 4.1-ppm resonance.

#### 4.3. Some caveats of PC- and SB-SE-LASER

Because of the very narrow bandwidth of the elementary pulses, PC-SE-LASER might possibly be less robust than SB-SE-LASER to small frequency fluctuations or shim degradations during the experiment. We think this is likely to explain the fact that, despite larger signal, COV on NAA signal attenuation is almost

identical between PC-SE-LASER acquisition and STE-LASER acquisition, despite larger signal with the PC-SE-LASER, whereas COV on NAA is much lower for SB-SE-LASER. Another advantage of the SB-SE-LASER is that it potentially enables measurements at shorter diffusion time than with PC-SE-LASER. However, SB-SE-LASER might be slightly less efficient than PC-SB-LASER to suppress the effect of J-coupling on the CH<sub>3</sub> lactate resonance, due to slightly larger residual refocusing of the coupling partner at 4.1 ppm. Myo-inositol appears to be quite distorted when using SE-LASER with selective refocusing. This is certainly due to the fact that resonances of Ins do not all experience perfect refocusing. Indeed, the elementary bandwidth of the PC pulse is too low to perform perfect refocusing across the whole chemical shift range of Ins resonances (~3.25–4.05 ppm). In the case of the SB pulse, the resonances lie right on the transition band. Hence, with PC or SB, Ins lineshape will not only be complex, but also very sensitive to frequency shift and B<sub>0</sub> inhomogeneity. Quantification of myo-inositol therefore remains challenging on such spectra, and might be improved in the future.

In general, the weaknesses associated with SB or PC pulses as mentioned above are expected to be mitigated when going at fields higher than 11.7 T, due to increased frequency dispersion between the different resonances of interest, allowing shorter RF pulses and larger (in Hz) transition bands.

## 5. Conclusion

By suppressing J-modulation, SE-LASER with a spectrally-selective refocusing pulse appears to be efficient to measure lactate attenuation at high *b*-values, while in the meantime retaining signal for other metabolites of interest (NAA and Ins). The two selective pulses investigated here, polychromatic and single-band, are overall similarly efficient, however they have specific limits and advantages. On one hand, the polychromatic pulse is slightly more selective, and hence provides slightly more signal on Lac and Ins, but is also more sensitive to frequency drifts or shim degradation. This pulse can thus be useful for the specific study of the lactate compartmentation in a small voxel where SNR is critically limited but B<sub>0</sub> very stable. On the other hand, the single-band pulse is more robust when B<sub>0</sub> is less stable, allows measuring more metabolites, and due to its shorter duration may allow reaching shorter TE and diffusion time if needed. Overall, going at field strengths even higher than 11.7 T might increase the benefit of using spectrally-selective pulses, as larger frequency dispersion between resonances impose less constraints on pulse profile and duration.

## Funding

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programmes (grant agreement No 818266).

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgement

None.

## References

- [1] J. Pfeuffer, I. Tkáč, R. Gruetter, Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (2000) 736–746, <https://doi.org/10.1097/00004647-200004000-00011>.
- [2] M. Palombo, C. Ligneul, J. Valette, Modeling diffusion of intracellular metabolites in the mouse brain up to very high diffusion-weighting: Diffusion in long fibers (almost) accounts for non-monoexponential attenuation, *Magn. Reson. Med.* 77 (2017) 343–350, <https://doi.org/10.1002/mrm.26548>.
- [3] M. Palombo, C. Ligneul, C. Najac, J. Le Douce, J. Flament, C. Escartín, P. Hantraye, E. Brouillet, G. Bonvento, J. Valette, New paradigm to assess brain cell morphology by diffusion-weighted MR spectroscopy in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 6671–6676, <https://doi.org/10.1073/pnas.1504327113>.
- [4] N. Shemesh, J.T. Rosenberg, J.-N. Dumez, S.C. Grant, L. Frydman, Distinguishing neuronal from astrocytic subcellular microstructures using in vivo Double Diffusion Encoded 1H MRS at 21.1 T, *PLOS ONE.* 12 (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185232> e0185232.
- [5] C. Ligneul, M. Palombo, E. Hernández-Garzón, M.-A. Carrillo-de Sauvage, J. Flament, P. Hantraye, E. Brouillet, G. Bonvento, C. Escartín, J. Valette, Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy enables cell-specific monitoring of astrocyte reactivity in vivo, *NeuroImage.* 191 (2019) 457–469, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.02.046>.
- [6] L. Pellerin, P.J. Magistretti, Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 10625–10629, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>.
- [7] P. Mächler, M.T. Wyss, M. Elsayed, J. Stobart, R. Gutierrez, A. von Faber-Castell, V. Kaelin, M. Zuend, A. San Martín, I. Romero-Gómez, F. Baeza-Lehnert, S. Lengacher, B.L. Schneider, P. Aebischer, P.J. Magistretti, L.F. Barros, B. Weber, Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons, *Cell Metab.* 23 (2016) 94–102, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.010>.
- [8] F. Yamasaki, J. Takaba, M. Ohtaki, N. Abe, Y. Kajiwara, T. Saito, H. Yoshioka, S. Hama, T. Akimitsu, K. Sugiyama, K. Arita, K. Kurisu, Detection and differentiation of lactate and lipids by single-voxel proton MR spectroscopy, *Neurosurg. Rev.* 28 (2005) 267–277, <https://doi.org/10.1007/s10143-005-0398-1>.
- [9] M. Dacko, T. Lange, Flexible MEGA editing scheme with asymmetric adiabatic pulses applied for measurement of lactate in human brain, *Magn. Reson. Med.* 85 (2021) 1160–1174, <https://doi.org/10.1002/mrm.28500>.
- [10] R.A. de Graaf, P.B. Brown, S. McIntyre, T.W. Nixon, K.L. Behar, D.L. Rothman, High magnetic field water and metabolite proton T1 and T2 relaxation in rat brain in vivo, *Magn. Reson. Med.* 56 (2006) 386–394, <https://doi.org/10.1002/mrm.20946>.
- [11] C. Ligneul, M. Palombo, J. Valette, Metabolite diffusion up to very high *b* in the mouse brain in vivo: Revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties, *Magn. Reson. Med.* 77 (2017) 1390–1398, <https://doi.org/10.1002/mrm.26217>.
- [12] N. Shemesh, J.T. Rosenberg, J.-N. Dumez, J.A. Muniz, S.C. Grant, L. Frydman, Metabolic properties in stroked rats revealed by relaxation-enhanced magnetic resonance spectroscopy at ultrahigh fields, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4958, <https://doi.org/10.1038/ncomms5958>.
- [13] J. Pauly, P. Le Roux, D. Nishimura, A. Macovski, Parameter relations for the Shinnar-Le Roux selective excitation pulse design algorithm (NMR imaging), *IEEE Trans. Med. Imaging.* 10 (1991) 53–65, <https://doi.org/10.1109/42.75611>.
- [14] V. Govindaraju, K. Young, A.A. Maudsley, Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites, *NMR Biomed.* 13 (2000) 129–153, [https://doi.org/10.1002/1099-1492\(200005\)13:3<129::AID-NBM619>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1099-1492(200005)13:3<129::AID-NBM619>3.0.CO;2-V).
- [15] S. Posse, C.A. Cuenod, D. Le Bihan, Human brain: proton diffusion MR spectroscopy, *Radiology.* 188 (1993) 719–725, <https://doi.org/10.1148/radiology.188.3.8351339>.
- [16] S.W. Provencher, Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel, *NMR Biomed.* 14 (2001) 260–264, <https://doi.org/10.1002/nbm.698>.
- [17] L.A. Stables, R.P. Kennan, A.W. Anderson, J.C. Gore, Density Matrix Simulations of the Effects of J Coupling in Spin Echo and Fast Spin Echo Imaging, *J. Magn. Reson.* 140 (1999) 305–314, <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1655>.

# Assessing potential correlation between $T_2$ relaxation and diffusion of lactate in the mouse brain

Eloïse Mougel | Sophie Malaquin | Julien Valette 

Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Université Paris-Saclay, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France

## Correspondence

Julien Valette, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Université Paris-Saclay, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), 18 Route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.  
Email: [julien.valette@cea.fr](mailto:julien.valette@cea.fr)

## Funding information

H2020 European Research Council, Grant/Award Number: 818266

**Purpose:** While diffusion and  $T_2$  relaxation are intertwined, little or no correlation exists between diffusion and  $T_2$  relaxation of intracellular metabolites in the rodent brain, as measured by diffusion-weighted MRS at different TEs. However, situation might be different for lactate, since it is present in both extracellular and intracellular spaces, which exhibit different diffusion properties and may also exhibit different  $T_2$ . Such a TE dependence would be crucial to account for when interpreting or modeling lactate diffusion. Here we propose to take advantage of a new diffusion sequence, where J-modulation of lactate is canceled even at long TE, thus retaining excellent signal, to assess potential  $T_2$  dependence on diffusion of lactate in the mouse brain.

**Methods:** Using a frequency-selective diffusion-weighted spin-echo sequence that removes J-modulation at 1.3 ppm, thus preserving lactate signal even at long TE, we investigate the effect of TE between 50.9 and 110.9 ms (while keeping diffusion time constant) on apparent diffusivity and kurtosis in the mouse brain.

**Results:** Regardless of the metabolites, no difference appears for the diffusion-weighted signal attenuation with increasing TE. For lactate, apparent diffusivity and kurtosis remain unchanged as TE increases.

**Conclusion:** No significant TE dependence of diffusivity and kurtosis is measured for lactate in the 50–110 ms TE range, confirming that potential  $T_2$  effects can be ignored when interpreting or modeling lactate diffusion.

## KEYWORDS

apparent diffusivity, apparent kurtosis, compartmentation, DW-MRS, frequency-selective sequence, intracellular/extracellular, lactate,  $T_2$  relaxation

## 1 | INTRODUCTION

Diffusion-weighted MRS (DW-MRS) is sensitive to the microstructure of the environment where metabolites are diffusing.<sup>1</sup> In parallel, microstructure and diffusion also influence the relaxation time  $T_2$ , so that  $T_2$  and diffusion

might be correlated, i.e., diffusion properties as measured with DW-MRS may depend on the TE. In white matter, biophysical models<sup>2</sup> used to estimate water diffusivity require taking into account both compartment-specific diffusion properties and compartment-specific  $T_2$ . Such a TE-dependency of water apparent diffusivity has been

observed previously in gray matter at 1.5T in human brain over a 54–130 ms TE range,<sup>3</sup> and in ex-vivo rat brain at 14.0T over a 24.2–100 ms TE range.<sup>4</sup> In other words, due to differences in compartmental  $T_2$  values,<sup>2</sup> with in particular extracellular  $T_2 \sim 1.5$ -fold longer than intracellular  $T_2$ , the ADC of extracellular water over-contributes to total water ADC when increasing TE.

Things seems to be simpler for intracellular metabolites in the mouse brain (mostly gray matter), where it was shown by Ligneul et al.<sup>5</sup> that signal attenuation is fundamentally unchanged when increasing TE from 33.4 ms to 73.4 ms (although N-acetylaspartate attenuation seemed to exhibit slight TE-dependency at the highest diffusion weighting [ $b$ -values], i.e., for  $b = 20$  and  $30 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ ). Nevertheless, the situation might be different for lactate, which is present in both intracellular and extracellular space,<sup>6</sup> two compartments which appear to have quite distinct diffusion properties,<sup>7</sup> and where  $T_2$  could also be different, like for water. This TE dependence could be an important point to investigate in the perspective of modeling DW-MRS data to determine lactate fraction in the different compartments in gray matter.<sup>8</sup> However, this issue has been eluded so far, due to the difficulty of measuring lactate diffusion, even more so when TE is increased.

Here, we use our recent frequency-selective DW-spin-echo (DW-SE) sequence,<sup>9</sup> where TE can be changed while canceling J-modulation on the  $\text{CH}_3$  lactate peak, thus preserving signal even at long TE. With this approach, we are able to measure apparent diffusivity and kurtosis of lactate for TE ranging from 50 to 110 ms in the mouse brain.

## 2 | METHODS

All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44), and authorized by the French Ministry of Education and Research. They were performed in an approved facility (authorization #B92-032-02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010-63/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering, and animal care was supervised by veterinarians and animal technicians. Mice were housed under standard environmental conditions (12-h light–dark cycle, temperature:  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and humidity: 50%) with ad libitum access to food and water.

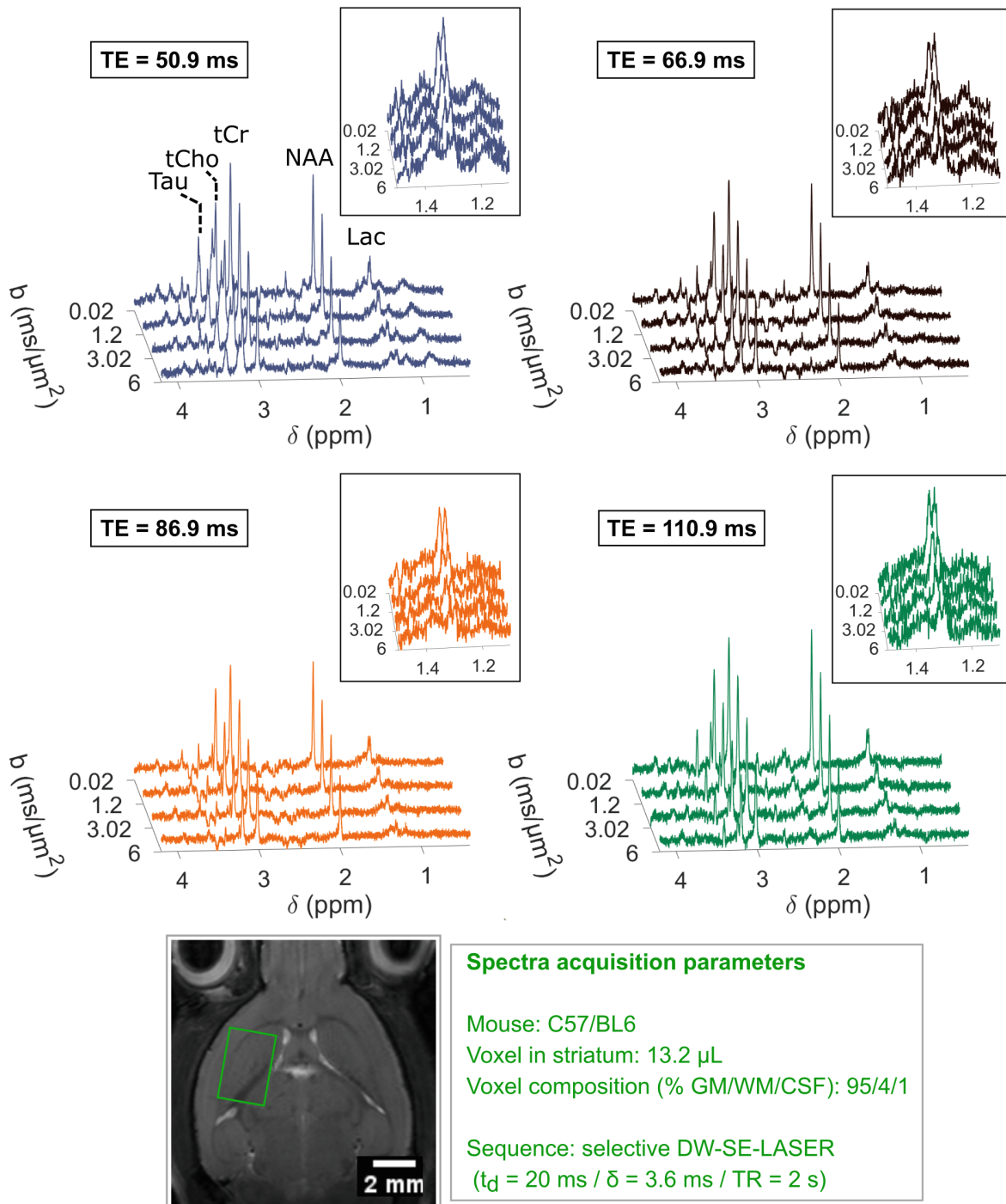
Experiments were performed on an 11.7T BioSpec Bruker scanner interfaced to PV6.0.1 (Bruker, Ettlingen, Germany). A quadrature surface cryoprobe (Bruker, Ettlingen, Germany) was used for transmission and reception. Six C57BL/6 mice were anesthetized with  $\sim 1.5\%$  isoflurane and maintained on a stereotaxic bed with a bite and two ear bars. Throughout the experiments, body

temperature was monitored and maintained at  $\sim 36^\circ\text{C}$  by warm water circulation. Breathing frequency was monitored using PC–SAM software (Small Animal Instruments, Inc., Stony Brook, NY).

A  $13.2\text{-}\mu\text{L}$  ( $3.3 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ ) spectroscopic voxel was placed in the striatum in such a way that CSF contamination was minimal ( $<1\%$ , as evaluated on anatomical images acquired with a RARE sequence with TE/TR = 30/2500 ms,  $78.1\text{-}\mu\text{m}$  isotropic resolution and 0.5-mm slice thickness, using manual segmentation with the Fiji distribution of the ImageJ software). Shimming was performed using Bruker's Mapshim routine, yielding a water linewidth of  $\sim 17 \text{ Hz}$ . DW-MRS acquisitions were performed using a spectrally-selective DW-SE-LASER sequence, where the SE part incorporates a 5-ms single-band spectrally selective refocusing pulse,<sup>9</sup> followed by LASER localization. The duration of the diffusion gradients was set to  $\delta = 3.6 \text{ ms}$ . Diffusion gradients were positioned around the spectrally-selective refocusing pulse, and separated by a delay  $\Delta = 21.2 \text{ ms}$ , resulting in diffusion time  $t_d = 20 \text{ ms}$ . Signal attenuation of N-acetylaspartate (NAA), choline compounds (tCho), creatine + phosphocreatine (tCr), taurine (Tau), and lactate (Lac) was measured for  $b = [0.02, 1.2, 3.02, 6] \text{ ms}/\mu\text{m}^2$ , at different TE = [50.9, 66.9, 86.9, 110.9] ms which were obtained by varying the delays before and after the diffusion gradients, i.e., keeping  $t_d$  constant (as well as the TE of the LASER part, and TR = 2 s). Due to their low signal especially at long TE, signal attenuation of other metabolites was not measured. Two sets of 32 repetitions were acquired for TE = 50.9, 66.9 and 86.9 ms; and three sets of 32 repetitions were acquired for TE = 110.9 ms to improve signal-to-noise ratio. The spectrally-selective pulse is generated to refocus the 0.1–4.0 ppm range, thus avoiding refocusing the 4.1-ppm CH lactate group coupled to the 1.3-ppm  $\text{CH}_3$ , resulting in suppression of J-modulation. Because of such frequency selectivity, no water suppression is required with this sequence. In addition, the diffusion gradient direction was changed at each repetition to perform powder-averaging corresponding to 32 different gradient directions, and the phase cycling was implemented to have a new phase at each new direction.

Individual scans were frequency- and phased-corrected before averaging, and spectra were analyzed with LCModel.<sup>10</sup> Experimental MM spectra, acquired for each TE using a double inversion recovery module ( $\text{TI}_1 = 2200 \text{ ms}$  and  $\text{TI}_2 = 770 \text{ ms}$ ) at  $b = 10 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  to remove potential residual metabolite signal, were included in LCModel basis-sets.

Signal attenuations were fitted over the whole  $b$ -range (corresponding to a low  $b$ -regime, within the convergence radius of the cumulant expansion<sup>11</sup>) to estimate the mean diffusivity and mean kurtosis, using the following



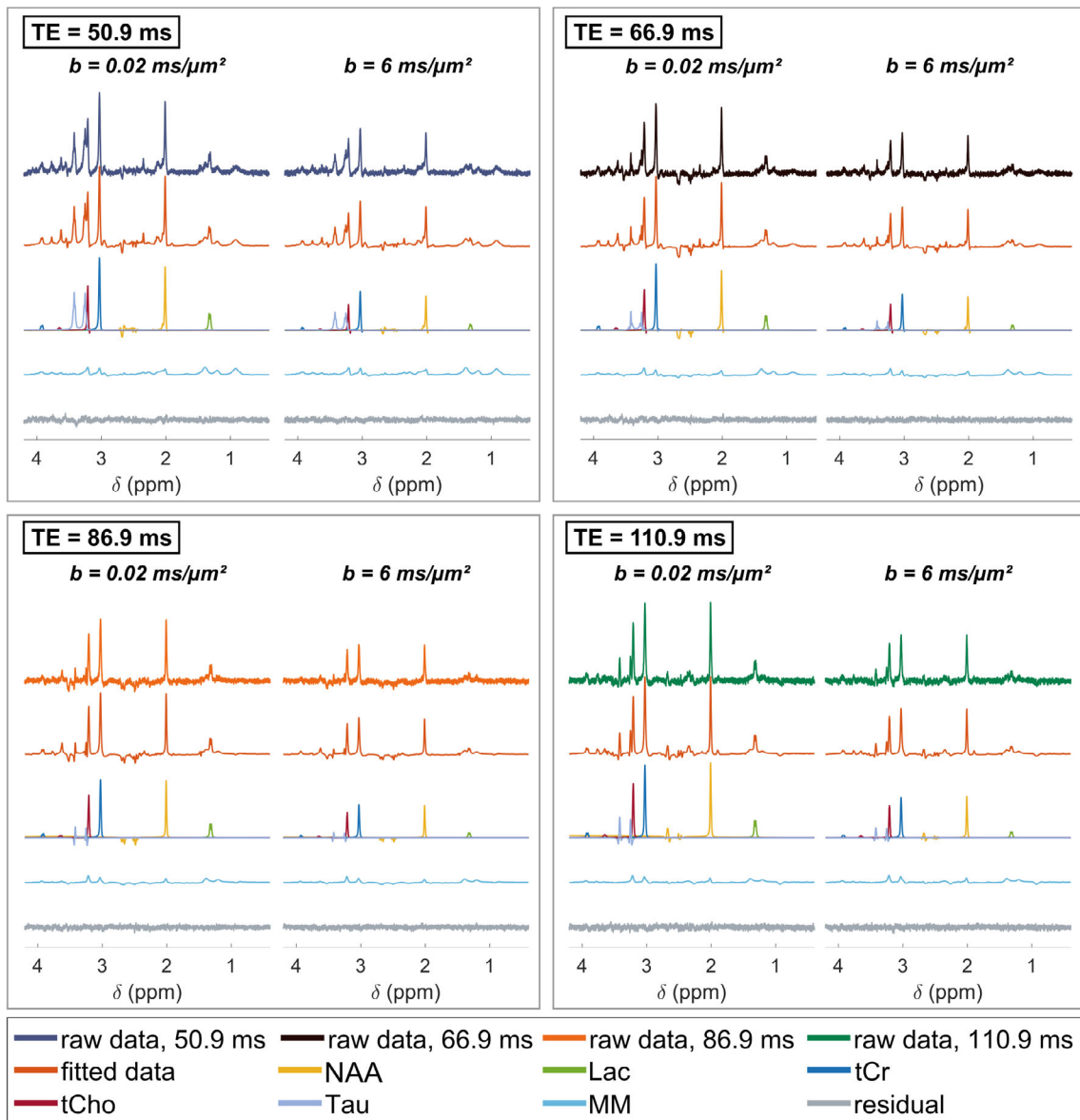
**FIGURE 1** Example of spectra at different diffusion-weightings, acquired in a 13.2- $\mu\text{L}$  voxel (bottom image) in the striatum of a single mouse at different TEs (while keeping constant  $t_d = 20$  ms). The contribution of CSF and white matter is  $<1\%$  and  $<4\%$  in the voxel of interest, respectively. The spectra at TE = 110.9 ms were acquired with  $3 \times 32$  repetitions versus  $2 \times 32$  repetitions for other TE (hence, the apparent larger signal and noise at TE = 110.9 ms). Lactate is still visible at the highest b-value

equation<sup>12</sup>:

$$S(b) = S(b = 0) \times \exp\left(-b D_{app} + \frac{1}{6} K_{app} (b D_{app})^2\right) \quad (1)$$

with  $D_{app}$  the apparent diffusivity (that we will use interchangeably with “ADC”) and  $K_{app}$  the apparent kurtosis.

Finally, statistical analysis was performed, with open-source software JASP (Version 0.16.0), using a one-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) to compare the  $D_{app}$  and  $K_{app}$  values across the six mice between TE. We checked for each repeated-measures ANOVA the sphericity assumption with a Mauchly’s



**FIGURE 2** Example of LCMoDel analysis at different diffusion-weightings and different TE, for data acquired in one mouse. For lactate, the Cramér-Rao lower bound (CRLB) is  $\sim 7\%$  in the worst condition (largest  $b$ -value for TE = 110.9 ms), and the average CRLB over all  $b$ -value and TE for this mouse is  $\sim 4\%$ . Average CRLB is  $\sim 2\%$  for NAA,  $\sim 1\%$  for tCr,  $\sim 2\%$  for tCho,  $\sim 4\%$  for Tau. The signal at TE = 110.9 ms appears just as high as at TE = 50.9 ms, due to the number of repetitions, which is  $3 \times 32$  for TE = 110.9 ms and  $2 \times 32$  for TE = 50.9 ms.

test. A post hoc test with Bonferroni correction was then performed to assess the inter TE significance.

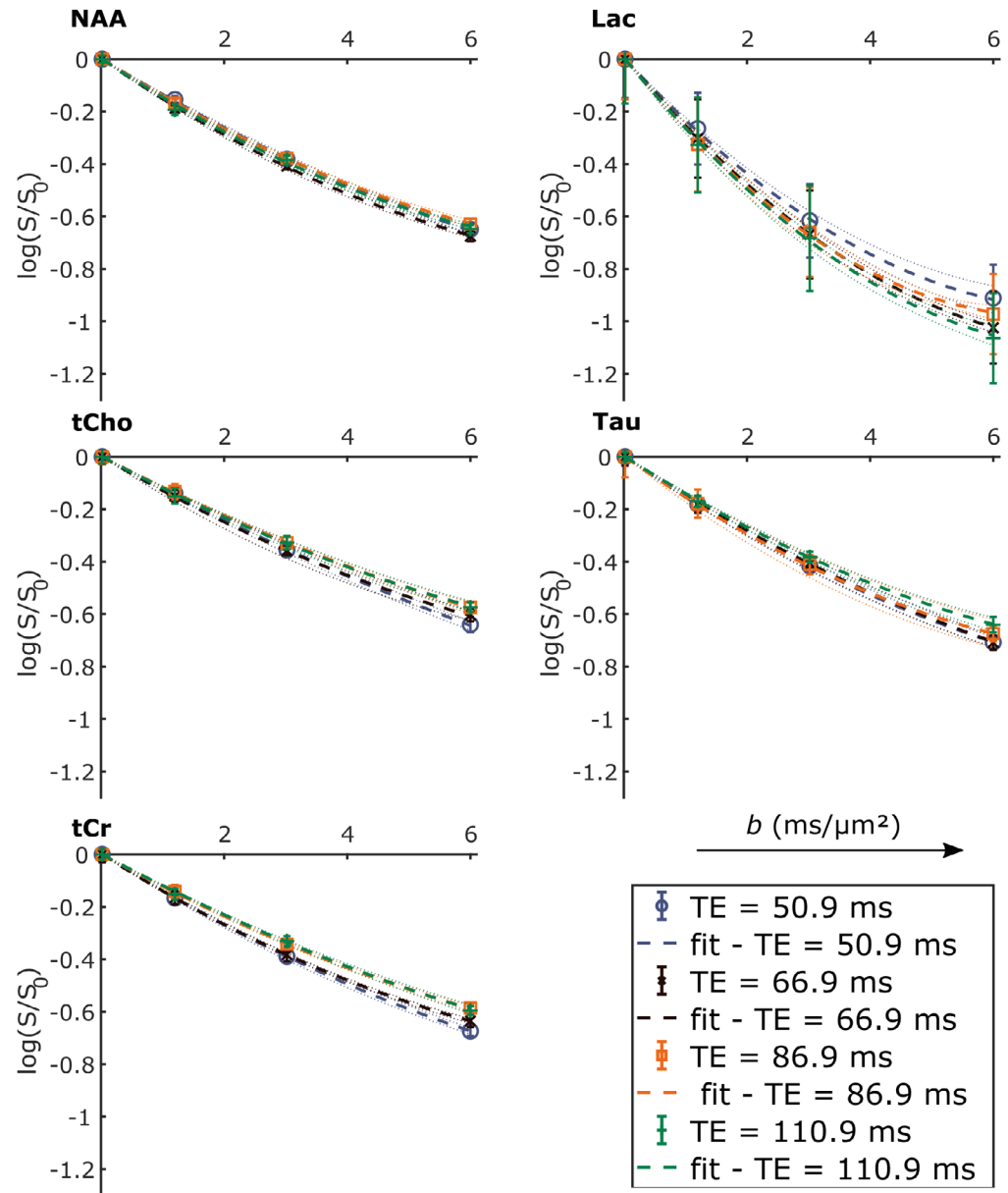
### 3 | RESULTS

The frequency-selective DW-SE sequence allows measuring lactate peak without J-modulation, regardless of TE. We observe (Figure 1) that the lactate peak is clearly visible on spectra even at long TE and for the largest  $b$ -value, despite the small voxel size. Such signal allows acceptable LCMoDel estimation (Figure 2) with CRLBs  $< 10\%$  in the worst condition ( $b = 6 \text{ ms}/\mu\text{m}^2$  and TE = 110.9 ms). This

highlights the interest of using the frequency-selective DW-SE sequence in the context of this study. Nevertheless, as already noted previously,<sup>9</sup> the myo-inositol peak ( $\sim 3.5 \text{ ppm}$ ) is quite low due to its location on the transition band of the spectrally-selective pulse (width  $\sim 0.9 \text{ ppm}$ ) giving an inversion of only  $\sim 80\%$ , resulting in relatively large quantification errors. Here myo-inositol signal is much smaller and could not be quantified properly at high  $b$ -value. We thus ignore it in the rest of this paper.

Visually, lactate signal attenuation over six mice appears to be quite similar for the different TE. Overall, this seems to be also the case for the other metabolites (Figure 3). Despite the efficiency of the sequence to

**FIGURE 3** Average measured signal attenuation and standard error of the mean (dot) for each metabolite over six mice for different diffusion times; average fit using Equation (1) (dashed line); and standard error of the mean of the fit (dotted line) over six mice overlaid on the same graph. Signal attenuations are similar regardless of TE. In this example, for all metabolites the model given by Equation (1) fits the data well



measure lactate, the standard error of the mean remains larger for lactate than for NAA or other more concentrated metabolites.

In the range of  $b$ -values chosen for this study, Equation (1) seems to correctly fit signal attenuation, as represented for example with the dashed lines in Figure 3. Corresponding  $D_{\text{app}}$  and  $K_{\text{app}}$  values (Figure 4) exhibit no significant change (calculated with a repeated-measures ANOVA) when increasing TE in the 50–110 ms range for all metabolites, except for tCr, which exhibits a slightly decreasing  $D_{\text{app}}$ . For intracellular metabolites,  $D_{\text{app}}$  is in the range  $[0.11; 0.16] \mu\text{m}^2/\text{ms}$  at all TE, while  $K_{\text{app}}$  remains in the range  $[1.1; 1.9]$ . For lactate, the kurtosis ( $\sim 1.4$ ) is constant and in the same range as for the other metabolites. Lactate diffusion ( $\sim 0.25 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) is higher than for other metabolites, suggesting some impact of

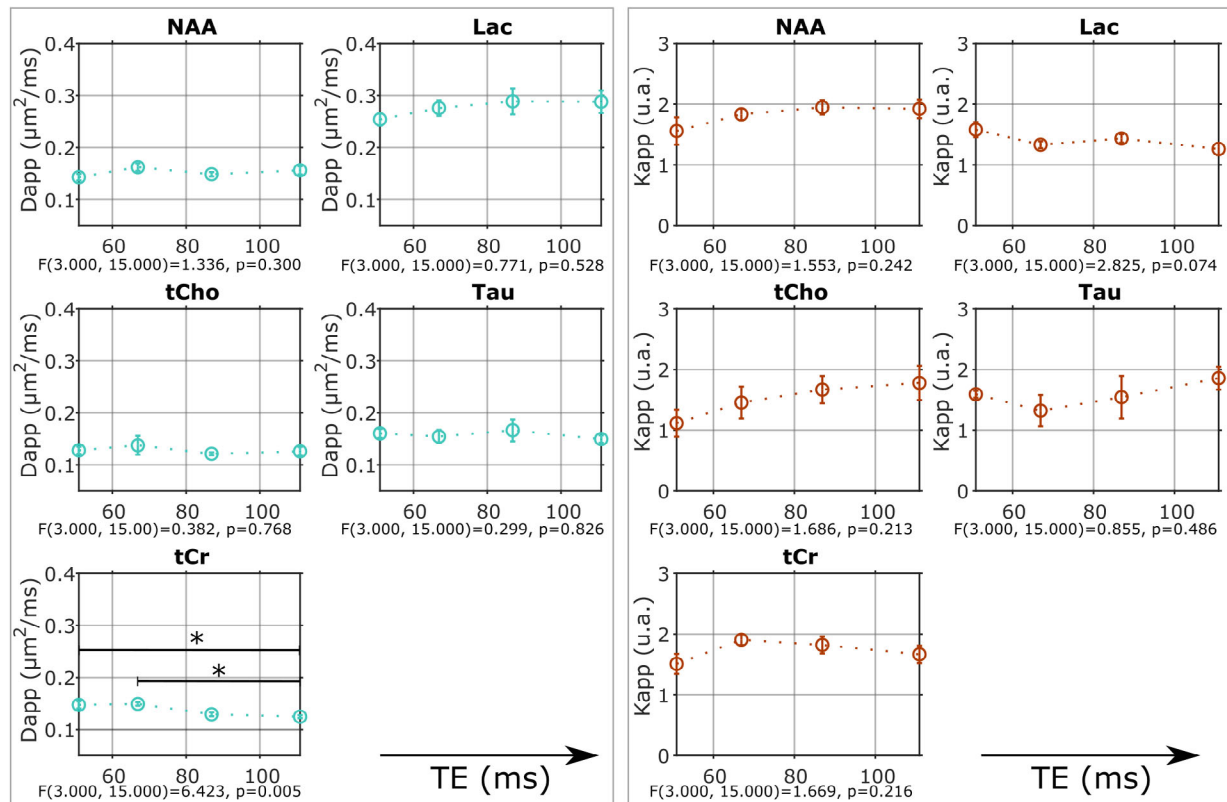
extracellular lactate with faster diffusivity, but no significant TE-effect is observed on these diffusion parameters.

## 4 | DISCUSSION

### 4.1 | ADC estimates in line with the literature

Despite difference in methodologies to estimate ADCs, our measurements ( $\sim 0.15 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ) are of the same order of magnitude as those previously reported in the literature ( $\sim 0.1 \mu\text{m}^2/\text{ms}$  using a DW-stimulated echo sequence + monoexponential fitting in a  $[0; 5] \text{ms}/\mu\text{m}^2$   $b$ -value range)<sup>5</sup> in the mouse brain for NAA, tCr, tCho, and Tau. Actually, considering the  $\sim 2$ -fold shorter diffusion time





**FIGURE 4** Average apparent diffusivity  $D_{app}$  and kurtosis  $K_{app}$  extracted from metabolite signal attenuation as a function of TE. Left:  $D_{app}$  is plotted as a function of TE. Repeated-measures ANOVA (reported by the F-test result below each graph) shows no significant variation except for tCr (\*:  $p < 0.05$  pairwise post hoc test with Bonferroni correction). Right:  $K_{app}$  is plotted as a function of TE. No significant variation is noted

used here ( $t_d = 20$  ms versus  $t_d = 63$  ms), our estimate of intracellular ADC is consistent with the increase in ADC as  $t_d$  decreases for relatively short  $t_d$ .<sup>13</sup> Lactate ADC being  $\sim 70\%$  larger than intracellular metabolite ADC presumably mostly reflects some extracellular contribution,<sup>7</sup> although lactate is also a smaller molecule with  $\sim 30\%$  larger intrinsic diffusivity.

## 4.2 | Lactate kurtosis measurements

To our knowledge, this study reports for the first time the measurement of kurtosis for lactate. Kurtosis appears quite similar between metabolites and is in line with our previous measurements for intracellular metabolites.<sup>14</sup> Hence lactate  $K_{app}$  appears to be less influenced by extracellular contribution than  $D_{app}$ .

## 4.3 | No TE-dependence of lactate diffusion

In gray matter, for TEs ranging from 50 to 110 ms, no dependence of diffusion on TE is observed for lactate, as

for almost all intracellular metabolites. To assess overall dependence on TE, a repeated-measures ANOVA is more relevant than a paired-samples t-test, nevertheless, a paired-samples t-test is sensitive to a 2-fold smaller difference than such ANOVA and could detect a difference of at least 15% (assessed a posteriori by Monte Carlo simulation for  $p < 0.05$ ). As shown in Table 1, even with the t-test sensitive to a smaller difference, no TE dependence is noted for lactate apparent diffusivity, and only one small difference ( $p$ -value = 0.04) is observed for apparent kurtosis between 50 ms and 67 ms, with the other comparisons clearly not significantly different ( $p$ -value  $> 0.1$ ). This therefore suggests the lack of a highly significant TE-dependence of diffusion for lactate, with a threshold of 15% difference on the diffusion parameters. These observations corroborate, over a wider TE range, previous measurements reported by Ligneul et al.<sup>5</sup> for intracellular metabolites. Considering that lactate is present in both intracellular and extracellular spaces, and that intra- and extracellular diffusion properties are expected to be quite different based on the latest works,<sup>7</sup> lack of TE-dependence for diffusion suggests that  $T_2$ s are not sufficiently different in both compartments for diffusion measurements to exhibit TE-dependency. Another way to

**TABLE 1**  $p$ -value obtained with two different analyses (repeated-measures ANOVA [RMANOVA] and paired-samples t-test) for  $D_{app}$  and  $K_{app}$  for lactate ( $^\dagger$ :  $p < 0.05$  paired-samples t-test)

Param	Test	p-Value					
		TE(50)-TE(67)	TE(50)-TE(87)	TE(50)-TE(111)	TE(67)-TE(87)	TE(67)-TE(111)	TE(87)-TE(111)
$D_{app}$	RMANOVA	0.528					
	paired-samples t-test	0.41	0.266	0.308	0.702	0.631	0.971
$K_{app}$	RMANOVA	0.074					
	paired-samples t-test	<b>0.044</b> ( $^\dagger$ )	0.304	0.112	0.333	0.533	0.127

Note: The repeated-measures ANOVA is the most appropriate test to assess whether a significant dependence of TE exists on diffusion parameters, nevertheless the paired-samples t-test is sensitive to a 2-fold smaller difference, (i.e., 15%  $D_{app}$  or  $K_{app}$  for lactate) (a posteriori estimation with Monte Carlo simulation for a paired-samples t-test and 95% confidence interval of the mean for RMANOVA). Although the paired-samples t-test would pick up lower difference, the results still do not exhibit significant difference for diffusion properties, except for the pairwise comparison between 50 ms and 67 ms for  $K_{app}$  (with a  $p$ -value  $\sim 0.044$ ).

look at it is that, despite lactate diffusion being quite different between compartments (as evidenced by the ADC higher than for purely intracellular metabolites, or suggested by other works<sup>7,8</sup>), microstructural differences do not influence  $T_2$ <sup>15,16</sup> to a large enough extent to produce detectable differences at the time scale of our experiment. Therefore, DW-MRS measurements are robust over such a wide range of TE, and diffusion models only considering diffusion properties in the different compartments (as well as potential inter-compartment exchange<sup>17,18</sup>), without considering differences in  $T_2$ , should be valid to model lactate diffusion.

#### 4.4 | tCr: specific behavior or artifact?

The small decrease in tCr apparent diffusivity remains of uncertain origin. Due to the different sizes for Cr and PCr, their  $D_{app}$  and  $T_2$  could be different enough to induce variability in tCr diffusivity. Nevertheless, since their spectra are very close at 11.7T except for the peaks at  $\sim 3.9$  ppm, it is difficult to discriminate the contributions of Cr and PCr using the spectrally selective SE sequence, because these 3.9-ppm peaks fall on the edge the transition band of the pulse ( $\sim 18\%$  inversion at 3.9 ppm), thus yielding almost no signal. The slight decrease of tCr  $D_{app}$  with increasing TE thus remains an open question. Interestingly, such behavior was reported in the human white matter, but at much longer diffusion time; at diffusion time closer to the one of the present study, the opposite behavior (ADC of tCr increasing with TE) was reported.<sup>19</sup>

## 5 | CONCLUSIONS

Using a frequency-selective DW-SE sequence, which allows measuring lactate diffusion without J-modulation,

we measured signal attenuation of lactate and other metabolites for different TE in the 50–110 ms range (while keeping diffusion delays constant), in a small voxel in the mouse brain. These measurements revealed no effect of TE on diffusion, neither for most intracellular metabolites, nor for lactate, which is in both intra and extracellular compartments. This suggests that lactate  $T_2$  in the intra and extracellular compartments is not sufficiently different to induce TE-dependency of measured diffusion properties. This in turn suggests that lactate diffusion can be modeled by considering only diffusion properties in the different compartments (as well as potential exchange), without taking into account relaxation effects.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programmes (grant agreement No 818266). The 11.7T MRI scanner was funded by a grant from "Investissements d'Avenir - ANR-11-INBS-0011 - NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences".

#### ORCID

Julien Valette  <https://orcid.org/0000-0002-2067-5051>

#### REFERENCES

- Ronen I, Valette J. Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *eMagRes*. 2015;4:733-750.
- Veraart J, Novikov DS, Fieremans E. TE dependent diffusion imaging (TEdDI) distinguishes between compartmental  $T_2$  relaxation times. *Neuroimage*. 2018;182:360-369.
- Vestergaard-Poulsen P, Hansen B, Østergaard L, Jakobsen R. Microstructural changes in ischemic cortical gray matter predicted by a model of diffusion-weighted MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26:529-540.

4. Buckley DL, Bui JD, Phillips MI, et al. The effect of ouabain on water diffusion in the rat hippocampal slice measured by high resolution NMR imaging. *Magn Reson Med.* 1999;41:137-142.
5. Ligneul C, Palombo M, Valette J. Metabolite diffusion up to very high b in the mouse brain in vivo: revisiting the potential correlation between relaxation and diffusion properties. *Magn Reson Med.* 2017;77:1390-1398.
6. Mächler P, Wyss MT, Elsayed M, et al. In vivo evidence for a lactate gradient from astrocytes to neurons. *Cell Metab.* 2016;23:94-102.
7. Vincent M, Gaudin M, Lucas-Torres C, Wong A, Escartin C, Valette J. Characterizing extracellular diffusion properties using diffusion-weighted MRS of sucrose injected in mouse brain. *NMR Biomed.* 2021;34:e4478.
8. Pfeuffer J, Tkáč I, Gruetter R. Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed non-invasively by diffusion-weighted <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:736-746.
9. Mougél E, Malaquin S, Vincent M, Valette J. Using spectrally-selective radiofrequency pulses to enhance lactate signal for diffusion-weighted MRS measurements in vivo. *J Magn Reson.* 2022;334:107113.
10. Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo <sup>1</sup>H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* 2001;14:260-264.
11. Fröhlich AF, Østergaard L, Kiselev VG. Effect of impermeable boundaries on diffusion-attenuated MR signal. *J Magn Reson.* 2006;179:223-233.
12. Jensen JH, Helpert JA. Quantifying non-Gaussian water diffusion by means of pulsed-field-gradient MRI. *Proc Intl Soc Mag Reson Med.* 2003;13:2154.
13. Valette J, Ligneul C, Marchadour C, Najac C, Palombo M. Brain metabolite diffusion from ultra-short to ultra-long time scales: what do we learn, where should we go? *Front Neurosci.* 2018;12:2.
14. Mougél E, Valette J, Palombo M. Investigating exchange, structural disorder and restriction in gray matter via water and metabolites diffusivity and kurtosis time-dependence. *Proc Intl Soc Mag Reson Med.* 2022;31:255.
15. Michaeli S, Garwood M, Zhu XH, et al. Proton T<sub>2</sub> relaxation study of water, N-acetylaspartate, and creatine in human brain using Hahn and Carr-Purcell spin echoes at 4T and 7T. *Magn Reson Med.* 2002;47:629-633.
16. Kiselev VG, Novikov DS. Transverse NMR relaxation in biological tissues. *Neuroimage.* 2018;182:149-168.
17. Lee HH, Papaioannou A, Novikov DS, Fieremans E. In vivo observation and biophysical interpretation of time-dependent diffusion in human cortical gray matter. *Neuroimage.* 2020;222:117054.
18. Palombo M, Shemesh N, Ronen I, Valette J. Insights into brain microstructure from in vivo DW-MRS. *Neuroimage.* 2018;182:97-116.
19. Branzoli F, Ercan E, Webb A, Ronen I. The interaction between apparent diffusion coefficients and transverse relaxation rates of human brain metabolites and water studied by diffusion-weighted spectroscopy at 7 T. *NMR Biomed.* 2014;27:495-506.

**How to cite this article:** Mougél E, Malaquin S, Valette J. Assessing potential correlation between T<sub>2</sub> relaxation and diffusion of lactate in the mouse brain. *Magn Reson Med.* 2022;88:2277-2284. doi: 10.1002/mrm.29395