



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE**

# **THESE**

Présentée par

**JULIEN DETOUR**

Soutenue le **02 Octobre 2013**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité / Discipline : **Sciences de la vie**

Caractérisation métabolomique des tissus épileptogènes par spectroscopie RMN à haute résolution à l'angle magique (RMN HRMAS): applications à l'épilepsie temporelle humaine et animale

## **Thèse dirigée par**

Pr. NAMER Izzie-Jacques    Professeur des Universités, Université de Strasbourg  
Dr. NEHLIG Astrid            Directrice de Recherche, INSERM

## **MEMBRES DU JURY**

Pr. CALDARELLI Stefano    Professeur des Universités, Université d'Aix-Marseille III (Rapporteur externe)  
Pr. DEVAUX Bertrand        Professeur des Universités, Université de Paris X  
Pr. RYVLIN Philippe        Professeur des Universités, Université de Lyon I (Rapporteur externe)  
Pr. SANDNER Guy            Professeur des Universités, Université de Strasbourg (Rapporteur interne)  
Président





**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE**

# **THESE**

Présentée par

**JULIEN DETOUR**

Soutenue le **02 Octobre 2013**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité / Discipline : **Sciences de la vie**

Caractérisation métabolomique des tissus épileptogènes par spectroscopie RMN à haute résolution à l'angle magique (RMN HRMAS): applications à l'épilepsie temporelle humaine et animale

## **Thèse dirigée par**

Pr. NAMER Izzie-Jacques    Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Dr. NEHLIG Astrid    Directrice de Recherche, INSERM

## **MEMBRES DU JURY**

Pr. CALDARELLI Stefano    Professeur des Universités, Université d'Aix-Marseille III (Rapporteur externe)

Pr. DEVAUX Bertrand    Professeur des Universités, Université de Paris X

Pr. RYVLIN Philippe    Professeur des Universités, Université de Lyon I (Rapporteur externe)

Pr. SANDNER Guy    Professeur des Universités, Université de Strasbourg (Rapporteur interne)  
Président



## REMERCIEMENTS

Je remercie vivement mes deux directeurs de thèse. Le Docteur Astrid Nehlig, pour son soutien, ses conseils, sa rigueur et sa disponibilité tout au long de ce travail et bien au delà. Vous m'avez connu externe, votre bienveillance, votre patience et votre confiance pendant toutes ces années ont été pour moi essentielles. Je vous remercie d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Mon travail a pu bénéficier de vos compétences scientifiques et de vos enseignements, je vous en suis reconnaissant. Le Professeur Izzie Jacques Namer, je vous remercie de m'avoir fait découvrir le domaine de la RMN HRMAS et d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Merci pour vos conseils, votre patience et votre confiance tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre indéfectible disponibilité et vos encouragements pour la réalisation ce travail.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à chacun des membres du jury. Merci pour vos conseils, vos critiques et vos contributions pour l'aboutissement de ce travail.

Je souhaite remercier, Monsieur le Professeur Stefano Caldarelli et Monsieur le Professeur Philippe Ryvlin, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur externe.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à Monsieur le Professeur Guy Sandner de me faire l'honneur de juger mes travaux en qualité de rapporteur interne. Je le remercie également pour ses cours que j'ai pu suivre au travers de mon cursus.

Je remercie également Monsieur le Professeur Bertrand Devaux et le Docteur Karim Elbayed pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité d'examineurs.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur François-Marie Moussallieh sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci de m'avoir permis de « dompter » un spectromètre, merci pour le temps passé, ma formation et nos échanges scientifiques souvent indispensables (pour moi). Je remercie également le Docteur Martial PIOTTO, pour les échanges fructueux, vos conseils et votre implication dans ce travail (notamment pour les acquisitions carbone 13).

Un grand merci au Professeur Edouard Hirsch, chef du service d'épileptologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et au Professeur Pierre Kerhli, chef du service de Neurochirurgie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour votre intérêt pour ce travail, votre implication et votre soutien. Merci également au Docteur Maria Paola Valenti, neurologue, praticien hospitalier au service d'épileptologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg pour ses précieux renseignements cliniques.

Mes remerciements s'adressent également aux Docteurs Michel Mohr et Brigitte Lannes, praticiens hospitaliers au service d'anatomie pathologique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Merci également à l'ensemble du personnel du service d'anatomopathologie et en particulier du centre de ressources biologiques pour leur implication dans le recueil et la préparation des échantillons humains. Je remercie également le Docteur Stéphane Kremer, radiologue aux Hopitaux Universitaires de Strasbourg pour l'analyse des IRM.

Merci à Pauline JUNG, attachée de recherche clinique du service d'épileptologie des HUS, pour votre soutien et votre bonne humeur pendant la collecte de nos « données patients ». Merci à Estelle Koning pour le travail indispensable pour la partie « animal » et merci pour ce soutien sans faille depuis de longues années. Sans vous ce travail n'aurait pu se faire. Merci également à Arielle Ferrandon, technicienne INSERM dans l'équipe du Dr Astrid Nehlig.

Je remercie également le Docteur Christian Kelche, directeur du Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC) ainsi que le Docteur Jean-Paul ARMSPACH, directeur de l'équipe imagerie *in vivo* au sein de ce laboratoire. Je remercie également l'ensemble du personnel du

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC). Merci également au Professeur Jean-Christophe Cassel de nous avoir permis d'accéder au dispositif de microondes pulsées.

Je souhaite également saluer et remercier mes collègues de thèse le Docteur Alessio Imperiale, les docteurs Malika Benhamed, Dora Ben Sellem, Baudoin Dillmann, Gilles Erb. Un grand merci également aux Docteurs Fabrice Hubele, Edmond Rust, Cyrille Blondet, Vincent Israel-Jost, Elodie Breton pour les échanges et la bonne humeur au quotidien.

Merci à tous les collègues, aux enseignants, aux docteurs ou professeurs que j'ai pu côtoyer au cours de mon cursus. Je remercie tout particulièrement le Docteur Jack Foucher qui m'a fait découvrir l'IRM et a accepté de m'encadrer au cours de mon DEA (il y a bien longtemps déjà...)

Merci à Cécile d'avoir supporté mes quelques absences pour la bonne cause... Merci à tout le personnel de la pharmacie et de la radiopharmacie et en particulier mes chefs de service les Docteurs Laurence BERETZ et Bénédicte GOURIEUX. Je remercie également le personnel du service de Médecine Nucléaire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ainsi que le Professeur Constantinesco.

Je remercie mes amis et collègues pharmaciens avec qui j'ai pu partager une partie de mon travail, Mathieu et Yvan merci pour nos échanges scientifiques et humains. Je remercie mes amis, moins concernés par ce travail mais qui ont été tout aussi important (la liste serait longue...).

Un remerciement particulier à ma famille pour son amour et son soutien.

Enfin merci à toi Anne, pour tout, pour ta patience et ton soutien dans la réalisation de ce travail et bien au-delà.

Je dédie cette thèse à mon père...

# **TABLE DES MATIERES**



# TABLE DES MATIERES

## Introduction générale

### ETAT DE LA QUESTION

<b>1. LA METABOLOMIQUE</b>	<b>p.12</b>
1.1 Complexité de la biologie et du vivant : la biologie des systèmes	p.12
1.2 Place de la métabolomique au sein des « omics »	p.15
1.3 Techniques mises en œuvre	p.18
1.4 Applications de la métabolomique en Neurosciences	p.19
<b>2. LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE HAUTE RESOLUTION A L'ANGLE MAGIQUE (RMN HRMAS)</b>	<b>p.20</b>
2.1 Historique de la Résonance Magnétique Nucléaire	p.20
2.2 Principes théoriques de la RMN et de la RMN HRMAS	p.21
2.3 Equipements RMN HRMAS	p.29
2.4 Méthodologie de traitement, de conservation et de préparation des échantillons	p.31
2.5 Traitement des données et statistiques appliquées aux acquisitions RMN HRMAS	p.36
<b>3. INTRODUCTION SUR L'EPILEPSIE</b>	<b>p.39</b>
3.1 Définition	p.39
3.2 Classification des crises et syndromes épileptiques	p.40
3.3 Epidémiologie	p.42
<b>4. EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL (ELT)</b>	<b>p.44</b>
4.1 Organisation du lobe temporal	p.44
4.2 Caractéristiques générales	p.47
4.3 Caractéristiques neuropathologiques	p.47
4.3.1 L'hippocampe	p.47
4.3.2 Anomalies neuropathologiques extrahippocampiques	p.50
4.3.3 Caractéristiques électro-cliniques des enregistrement EEG à l'aide d'électrodes profondes implantées chez des patients atteints d'EMLT	p.52
<b>5. LA CHIRURGIE DE L'EPILEPSIE</b>	<b>p.55</b>
<b>6. HYPOTHESE NEUROMETABOLIQUE DE L'ELT</b>	<b>p.61</b>
6.1 Arguments en faveur d'une hypothèse neurométabolique de l'ELT	p.61
6.2 Métabolisme glio-neuronal	p.63
6.3 Apport de la SRMN à l'exploration physiopathologique de l'ELT	p.66
6.3.1 Généralités sur la RMN	p.66
6.3.2 Apports de la spectroscopie RMN <i>in vivo</i>	p.67
6.3.3 Apports de la spectroscopie RMN <i>ex vivo</i>	p.72
<b>7. LE MODELE D'ELT LITHIUM-PILOCARPINE</b>	<b>p.76</b>
7.1 Généralités	p.76
7.2 Description du modèle	p.77
7.3 Décours temporel	p.80
7.3.1 L'état de mal (EdM)	p.80
7.3.2 La phase de latence	p.80
7.3.3 La phase chronique	p.81
7.4. Conséquences neuropathologiques	p.82
7.4.1 Pertes cellulaires	p.82
7.4.2 Les réorganisations	p.82
7.5 Caractérisation métabolique et enjeu de notre travail	p.84

## SECTION EXPERIMENTALE

### 1. EXPERIENCE 1 : Evaluation des méthodes de fixation du tissu cérébral par microondes pulsées sur le métabolome cérébral du rat et leur impact sur les signaux RMN $^1\text{H}$ HRMAS (publication en annexe 1)

<b>1.1 Objectifs</b>	<b>p.88</b>
<b>1.2 Matériel et méthodes</b>	<b>p.88</b>
1.2.1 Animaux	p.88
1.2.2 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques	p.88
1.2.3 Acquisition des spectres $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS	p.90
1.2.4 Traitement des données et analyses statistiques	p.90
<b>1.3 Résultats</b>	<b>p.91</b>
1.3.1 Concentrations moyennes en métabolites selon la technique de fixation	p.91
1.3.2 Analyse par ACP des différents groupes	p.93
1.3.3 Etude de la stabilité des signaux RMN $^1\text{H}$ HRMAS sur 15h	p.95
<b>1.4 Discussion</b>	<b>p.100</b>

### 2. EXPERIENCE 2 : Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) du modèle lithium-pilocarpine à l'aide de substrats marqués au carbone 13 pour l'étude différentielle des voies métaboliques gliales et neuronales

<b>2.1 Objectifs</b>	<b>p.104</b>
<b>2.2 Matériel et méthodes</b>	<b>p.104</b>
2.2.1 Induction de l'état de mal épileptique	p.104
2.2.2 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques	p.105
2.2.3 Acquisition des spectres $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS	p.106
2.2.4 Acquisition des spectres $^{13}\text{C}$ 1D RMN HRMAS	p.106
2.2.5 Traitement des données et analyses statistiques	p.107
<b>2.3 Résultats</b>	<b>p.107</b>
2.3.1 Quantification des métabolites par $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS	p.107
2.3.2 Analyse des données $^1\text{H}$ selon une analyse discriminante par la méthode de régression aux moindres carrés partiels (PLS-DA)	p.111
2.3.3 Résultats des acquisitions $^{13}\text{C}$ 1D RMN HRMAS pour l'analyse différentielle des métabolismes gliaux et neuronaux	p.114
<b>2.4 Discussion</b>	<b>p.118</b>
2.4.1 Acquisitions $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS et analyses multivariées	p.118
2.4.2 Acquisitions $^{13}\text{C}$ 1D RMN HRMAS	p.121

<b>3. EXPERIENCE 3 : Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS (<sup>1</sup>H) de tissus épileptogènes humains issus de la chirurgie</b>	
<b>3.1 Objectifs</b>	<b>p.125</b>
<b>3.2 Matériel et méthodes</b>	<b>p.125</b>
3.2.1 Caractéristiques des patients	p.125
3.2.2 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques	p.129
3.2.3 Acquisition des spectres <sup>1</sup> H 1D RMN HRMAS	p.129
3.2.4 Traitement des données et analyses statistiques	p.129
<b>3.3 Résultats</b>	<b>p.130</b>
3.3.1 Quantification des métabolites	p.130
3.3.2 Analyse des données <sup>1</sup> H selon une analyse discriminante par la méthode de régression aux moindres carrés partiels (PLS-DA)	p.131
3.3.2.1 Analyse par structure cérébrale	p.131
3.3.2.2 Analyse du tissu hippocampique	p.134
3.3.2.3 Analyse du cortex temporal	p.136
<b>3.4 Discussion</b>	<b>p.137</b>
<b>4. DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES</b>	<b>p.141</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>p.145</b>
<b>ANNEXE 1</b>	
<b>ANNEXE 2</b>	



## LISTE DES ABREVIATIONS

$^{13}\text{C}$  : Carbone13

Ace : Acétate

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

Ala : Alanine

ARN : Acide Ribonucléique

Asc : Ascorbate

Asp : Asparate

Cho : Choline

CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill

Cr : Créatine

EEG: Electroencéphalographie

ERETIC : Electronic REference To access In-vivo Concentrations

ETPR: Epilepsie temporal pharmacorésistante

FDG :  $^{18}\text{F}$ -fluorodésoxyglucose

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

Gln : Glutamine

Glu : Glutamate

Gly : Glycine

GPCho : GlycéroPhosphoCholine

Glx : Glutamate + Glutamine

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz : Hertz

KHz : kilohertz

ILAE : International League Against Epilepsy

IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique Fonctionnelle

Lac : Lactate

LCR : Liquide Céphalorachidien

Lys : Lysine

mIns : Myoinositol

NAA : N-Acétylaspartate

NOE : Effet Nucléaire Overhauser (Nuclear Overhauser Effect)

PCho : Phosphocholine

Ppm: Partie Par Million

PLS-DA : Partial Least Squares Discriminant Analysis

RF : radiofréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning

SEEG: Stéréo-Electroencéphalographie

SM : Spectrométrie de Masse

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SRMN : Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

Succ : Succinate

Tau : Taurine

TDN : Tumeur Dysembryoplasique Neuroépithéliale

TEP : Tomographie à Emission de Positron

TMS : Tétraméthylsilane

Val : Valine

ZrO<sub>2</sub> : Oxyde de Zirconium

## Liste des figures

**Figure 1.** Voie d'émergence pour une application médicale des données issues de différents domaines « d'omics ». (Figure issue de O'Shea, 2012)

**Figure 2.** (A) Vision initiale de la biologie moléculaire pour laquelle le flux d'information va du gène à la protéine (B) Vision générale des « omiques » où le flux d'information va du gène aux métabolites ensemble de messages les plus proche du phénotype. (C) A gauche, vision linéaire initiale des voies métaboliques ; à droite représentation non linéaire les points représentent les métabolites, les connexions les enzymes (figure issue de Holywood et al., 2006).

**Figure 3.** Nombres de publications depuis 2000 issues de l'application «*web of knowledge*» (<http://apps.webofknowledge.com>) avec les mots clés suivant : (a) metabolomics+NMR, metabonomics+NMR ; (b) metabolomics+NMR+disease, metabonomics+NMR+disease. D'après Abdul-Hamid et al., 2013.

**Figure 4.** Comparatif entre RMN et SM pour leur application en métabolomique (figure issue de Erb, 2008 adaptée de Robertson, 2005)

**Figure 5.** Couplage spin-spin (ij) dans un champs magnétique  $B_0$ .

**Figure 6.** Dispositif général d'un spectromètre.

**Figure 7.** Installation de notre spectromètre BRUKER Avance III (500 MHz).

**Figure 8.** Partie connectique de la sonde HRMAS.

**Figure 9.** (A) Représentation du basculement de l'échantillon à 54,7°C par rapport au champ magnétique principal. (B) Tête de mesure de la sonde RMN HRMAS pour rotor de 4 mm (Photographie de Doty Scientific Inc. Lindon et al, 2008 ; d'après Benhamed, 2012).

**Figure 10.** Préparation d'un échantillon biologique pour analyse RMN HRAMS. (A) L'échantillon est récupéré du du congélateur à -80°C et placé dans un cryostat (-20°C). (B) La biopsie est dissequée ou "punchée" afin d'être introduite dans un insert. (D) Insert final. D'après Piotto et al. (2012).

**Figure 11.** Schéma de préparation d'un insert (d'après Erb, 2008).

**Figure 12.** Topographie de l'hippocampe et des cortex limbiques associés chez l'homme

**Figure 13.** Schéma des connexions anatomiques au sein de l'hippocampe chez le rat.

**Figure 14.** Comparaison de coupes histologiques de scléroses hippocampiques chez l'homme (à gauche) et le rat (à droite).

**Figure 15.** Les différents types d'électrodes pour l'enregistrement intracérébral (d'après, Noachtar et al., 2008)

**Figure 16.** Proposition de classification de sous type d'ELT selon la topographie d'initiation des décharges observées sur les enregistrements intracérébraux profonds (d'après Kahane et al., 2010).

**Figure 17.** Arbre décisionnel des explorations fonctionnelles pour le traitement chirurgical d'une épilepsie du lobe temporal (d'après Noachtar and Borggraefe et al., 2009).

**Figure 18.** Couplage métabolique astrocyte/neurone. Par le biais du glutamate, l'activation neuronale active la glycolyse anaérobie astrocytaire. Ceci conduit à la formation de lactate qui pourra être en retour utilisé dans le compartiment neuronal (d'après Magistretti, 1999).

**Figure 19 :** Modèle métabolique proposé par Petroff et al. (2002) pour l'interprétation des données RMN après perfusion à l'aide de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose.

**Figure 20.** Schéma simplifié des possibles isotopomères issus du métabolisme de l'unité glioneuronale engendrés par l'administration de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate après un premier tour du cycle des acides tricarboxyliques. D'après Melo et al. (2005).

### **EXPERIENCE 1 : Evaluation des méthodes de fixation du tissu cérébral par microondes pulsées sur le métabolome cérébral du rat et leur impact sur les signaux RMN $^1\text{H}$ HRMAS** *(publication en annexe 1)*

**Figure 21.** Schéma expérimental pour l'étude comparative des méthodes de fixation. Sans exposition aux microondes groupe par simple immersion dans l'azote liquide : groupe FN ; Exposition in vivo aux microondes pulsées haute énergie : groupe MW ; Immersion dans l'azote liquide et exposition aux microondes domestiques : groupe FN+MWd.

**Figure 22.** Représentation graphique des modèles ACP effectuée à partir des acquisitions RMN  $^1\text{H}$  HRMAS basée sur leurs deux premières composantes. Figure issue de Detour et al. (2011).

**Figure 23.** Illustration de l'évolution des spectres RMN  $^1\text{H}$  HRMAS acquis au cours du temps d'une biopsie cérébrale de rats en fonction de la méthode de fixation (par immersion dans l'azote liquide (FN groupe), par microondes pulsées (MWp groupe) et azote liquide + microondes domestiques (FN+MWd groupe).

**Figure 24.** Représentation graphique des concentrations relatives moyennes au cours du temps de chaque métabolite pour chaque technique de fixation : immersion immédiate dans l'azote liquide (FN groupe, en bleu), exposition préalable à des microondes pulsées (MWp groupe, rouge), exposition à des microondes non pulsées (FN+MWd groupe, en vert. Figure issue de Detour et al. (2011).

**Figure 25.** Représentation graphique des modèles ACP effectuée à partir des acquisitions RMN  $^1\text{H}$  HRMAS basée sur leurs deux premières composantes. L'ensemble des modèles représentés à gauche de la figure ont été réalisés en tenant compte de l'ensemble des régions spectrales graphiques (A, C, E). L'ensemble des modèles représentés à droite tiennent compte des régions spectrales de 16 métabolites (B, D, F). Figure issue de Detour et al. (2011).

### **EXPERIENCE 2 : Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) du modèle lithium-pilocarpine à l'aide de substrats marqués au carbone 13 pour l'étude différentielle des voies métaboliques gliales et neuronales**

**Figure 26.** Schéma expérimental pour l'induction de l'état de mal épileptique dans le modèle lithium-pilocarpine.

**Figure 27.** Protocole expérimental de l'étude du modèle lithium-pilocarpine par RMN HRMAS.

**Figure 28.** Représentation graphique des concentrations en  $\text{nmol.mg}^{-1}$  (glutamate, N-acétylaspartate (NAA), GABA, aspartate) mesurées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour chacun des groupes de rats (Li-NaCl en noir ou Li-pilo en blanc) en fonction de la structure cérébrale.



**Figure 29.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies cérébrales analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour les deux groupes de rats étudiés ; groupes Li-NaCl (carrés plein) et Li-pilo (carrés vides) pour le cortex entorhinal, l'hippocampe et le cortex cérébral. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo).

**Figure 30.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies cérébrales analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour les deux groupes de rats étudiés ; groupes Li-NaCl (carrés plein) et Li-pilo (carrés vides) pour le thalamus et le tronc cérébral. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo).

**Figure 31.** Spectre 1D RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS d'une biopsie de cortex entorhinal d'un rat Sprague-Dawley 5 mois après l'induction d'un état de mal épileptique à l'aide de lithium et de pilocaprine. \* : signaux associés aux acides gras. Ala : alanine ; Asp : aspartate ; GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; Glu : glutamate ; Gln : glutamine ; Tau : taurine. CX : position de l'atome de carbone 13.

**Figure 32.** Comparaison des concentrations en métabolites mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS et marqués en position 3 entre le groupe Li-NaCl et Li-pilo en unité arbitraire (u.a.) suite à la métabolisation de deux substrats coadministrés [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]glucose et de [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ ]acétate.

**Figure 33.** Comparaison des concentrations mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS en métabolites et marqués en position 2 et 4 entre le groupe Li-NaCl et Li-pilo en unité arbitraire (u.a.) suite à la métabolisation de deux substrats coadministrés [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]glucose et de [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ ]acétate.

### **EXPERIENCE 3 : Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS ( $^1\text{H}$ ) de tissus épileptogènes humains issus de la chirurgie**

**Figure 34.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies cérébrales issues de patients épileptiques analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS en fonction des structures cérébrales analysées. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo).

**Figure 35.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies d'hippocampes issues de patients épileptiques analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS en fonction de leurs caractéristiques histologiques : hippocampe sans sclérose, hippocampe avec sclérose et hippocampe sans sclérose issu de patients atteints de tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale (TDN) extramésiale. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes.

**Figure 36.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies de cortex temporal de patients épileptiques analysées par RMN <sup>1</sup>H HRMAS en fonction du statut histologique de l'hippocampe (avec et sans sclérose). A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes. Le tableau résume les caractéristiques statistiques du modèle et les métabolites discriminants.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Concentration cérébrale de certains métabolites en fonction de la technique de prélèvement (d'après Lust et al., 1973).

**Tableau 2.** Eléments de définitions de la crise épileptique et de la maladie épileptique proposés par l'ILAE (d'après Fisher et al., 2005).

**Tableau 3.** Seconde classification **des maladies épileptiques** d'après la ligue internationale contre l'épilepsie (*Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1989*).

**Tableau 4.** Exemples d'éléments localisateurs dans la sémiologie des crises (d'après Kurthen et al., 2008).

**Tableau 5.** Signes typiques en cas de syndrome d'épilepsie du lobe temporal mésial (MTLE) (d'après Kurthen et al. 2008).

**Tableau 6.** Présentation d'études réalisées en SRMN *in vivo* chez des patients atteints d'ELT depuis la revue de Hajek et al. (1998).

**Tableau 7.** Concentration en métabolites (en nmol/mg) en fonction du statut histologique (d'après Aasly et al., 1999).

**Tableau 8.** Comparaison des concentrations moyennes en métabolites obtenus par RMN <sup>1</sup>H HRMAS sur des biopsies cérébrales de rats selon la technique de fixation (en nmol.mg<sup>-1</sup>) : technique classique d'immersion dans l'azote liquide (FN groupe), exposition préalable à des microondes pulsées (MWp groupe), immersion dans l'azote et exposition à des microondes non pulsées (FN+MWd).

**Tableau 9.** Résultats statistiques des analyses ACP issus des différents modèles tels que représentés figure 22. Les résultats rapportés tiennent compte des deux premières composantes de chaque modèle.

**Tableau 10.** Résumé des différences statistiquement significatives de concentrations en métabolites après différents temps d'acquisition (10 min, 4h et 15h) pour des biopsies cérébrales de rats après fixation par immersion dans l'azote liquide (FN groupe), par microondes pulsées (MWp groupe) et azote liquide suivi de microondes domestiques (FN+MWd groupe). Un test non paramétrique pour échantillons appariés a été appliqué. Tableau issu de Detour et al. (2011).

**Tableau 11.** Comparaison des concentrations en métabolites mesurées par RMN <sup>1</sup>H HRMAS pour chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo) en fonction de chaque structure cérébrale (cortex entorhinal, hippocampe, cortex cérébral).

**Tableau 12.** Comparaison des concentrations en métabolites mesurés par RMN <sup>1</sup>H HRMAS pour chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo) en fonction de chaque structure cérébrale (thalamus, tronc cérébral). Les résultats indiquent des moyennes (en nmol.mg<sup>-1</sup> de tissu) ± l'écart-type.

**Tableau 13.** Résultats statistiques des modèles PLS-DA confrontant pour chaque structure cérébrale indiquée les deux groupes de rats Li-NaCl et Li-pilo..

**Tableau 14.** Caractéristiques des patients épileptiques pharmacorésistants inclus dans notre étude. CBZ : carbamazépine ; CLO : clobazam ; LEV : levetiracétam ; LTG : lamotrigine ; OXC : oxcarbamazépine ; PC : prise de contraste en IRM après injection de gadolinium ; SH : sclérose de l'hippocampe ; TOP : topiramate ; VAL : valproate de sodium ; VGB : vigabatrin.

**Tableau 15.** Concentration moyenne des métabolites en nmol.mg-1 dans l'hippocampe en fonction du groupe de patients.

**Tableau 16.** Résultats statistiques des modèles PLS-DA confrontant à chaque fois deux types de structures cérébrales issues de l'ensemble des patients épileptiques inclus.

## **Introduction générale**

## Introduction générale

Au sein des neuropathologies, l'épilepsie a la prévalence la plus importante et semble atteindre 1% de la population mondiale. La classification des syndromes épileptiques repose essentiellement sur leur étiologie et leur topographie (International League Against Epilepsy (ILAE), commission on classification, Berg et al., 2010). L'épilepsie du lobe temporal mésial (ELTM) se définit par une origine topographique des crises au sein des structures temporales mésiales. Ce syndrome est le plus souvent associé à une sclérose de l'hippocampe. D'un point de vue histologique il s'agit d'une perte sélective de neurones, d'une gliose réactionnelle accompagnée de plasticité cellulaire spécifique. Il a par ailleurs été montré que des modifications fonctionnelles peuvent toucher d'autres aires du lobe temporal comme le cortex entorhinal, le cortex périrhinal, le gyrus parahippocampique ou l'amygdale et même s'étendre au thalamus voire à des structures contralatérales. Cette épilepsie est l'une des plus fréquentes (Kun et al., 1999) et est souvent pharmacorésistante. En effet, bien que les crises puissent être contrôlées par un traitement médicamenteux, il apparaît fréquemment un échappement au long cours et la seule alternative à la diminution voire la suppression des crises est la résection chirurgicale. La stratégie chirurgicale actuellement la plus couramment retenue est une amygdalohippocampectomie totale accompagnée d'une extension plus ou moins importante des structures temporales adjacentes.

Parmi les hypothèses physiopathologiques de l'ELTM de nombreux arguments mettent en évidence un déséquilibre neurométabolique non seulement au sein des zones qualifiées d'épileptogènes mais également au delà dans un réseau plus large, le plus souvent décrit comme hyperexcitable. Bien que restant débattue, une origine neurométabolique reste un axe de recherche majeur. Dans l'épilepsie du lobe temporal un hypométabolisme est le plus souvent observé en tomographie par émission de positons au  $^{18}\text{F}$ -fluorodésoxyglucose (FDG) chez 80 à 90% des patients (Gok et al., 2013 ; Nelissen et al., 2006 ; Spencer et al., 1995). Au cours des années 90, de nombreuses études menées chez les patients présentant une épilepsie temporo-mésiale ont montré, en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), une baisse systématique d'un métabolite, le N-acétylaspartate, chez 70 à 100% des patients (Pan et al., 2008). A l'aide des techniques de microdialyse *in vivo*, une augmentation de glutamate a été observée (During et Spencer, 1993 ; Cavus et al., 2005). De plus de nombreuses données issues de la littérature suggèrent un lien direct entre niveau cérébral de glutamate et activités électrophysiologiques à la fois chez les patients et dans de nombreux modèles animaux.

La métabolomique a pour objet l'identification et la quantification de métabolites dans un échantillon biologique. La spectroscopie par résonance magnétique du proton à haute résolution à l'angle magique (RMN HRMAS) permet d'identifier et quantifier une quarantaine de métabolites selon une sensibilité de l'ordre d'une dizaine de micromoles tout en s'affranchissant des étapes d'extraction. En effet le basculement à l'angle magique de l'échantillon ( $54,7^\circ$ ) permet de s'affranchir des inhomogénéités de champs induites par un échantillon hétérogène ou semi-solide comme un tissu biologique. Il s'agit d'un avantage méthodologique majeur. En effet à ce jour l'ensemble des études menées *ex vivo* sur des tissus humains ont eu recours à la technique de la RMN liquide qui impose au préalable diverses étapes d'extraction des métabolites d'intérêt. La RMN HRMAS rend possible une analyse directe du tissu biologique étudié sans extraction (cas de la RMN liquide) ni transformation (cas de la spectrométrie de masse). Les résultats rapportés par les quelques études ayant appliqué cette technique d'analyse aux tissus issus de la chirurgie de l'épilepsie du lobe temporal suggèrent des différences de concentration pour certains métabolites en fonction de la présence ou de l'absence d'une sclérose de l'hippocampe (Aasly et al., 1999 ; Peeling et al., 1993 ; Petroff et al., 1989, 1995, 1998, 2002a ; Vielhaber et al., 2008). Toutefois l'interprétation de ces résultats reste discutée et ces études restent peu nombreuses et souffrent par ailleurs de limitations méthodologiques importantes : (i) Les effectifs totaux de ces études ne sont jamais supérieurs à 25 (la plus part du temps inférieur à 20) et l'on observe une grande hétérogénéité d'étiologie d'ELTM (ii) toutes ces études ont eu recours à la RMN liquide nécessitant une extraction préalable des métabolites étudiés (iii) aucune de ces études n'a intégré de traitement statistique multivarié dans l'analyse des profils métaboliques. Il s'agissait le plus souvent de comparaison deux à deux des moyennes de concentrations en métabolites. A ce jour une caractérisation métabolomique par RMN HRMAS des tissus cérébraux obtenus lors de la chirurgie de l'épilepsie n'a pas encore été effectuée.

Par ailleurs certaines caractéristiques neuropathologiques parmi lesquelles la gliose mésiale observée chez une majorité des patients ELTM suggère une contribution astrocytaire dans les mécanismes physiopathologiques. Dans le même temps de nombreuses études neurométaboliques ont mis en évidence les interactions entre neurotransmission et métabolisme. C'est le cas notamment du couplage astrocyte-neurone concernant le cycle glutamate/glutamine et la captation du glucose cérébral (Nehlig and Cole, 2007). Chez le patient atteint d'ELTM, Petroff et al. (2002b) ont mis en évidence un déséquilibre du cycle glutamate/glutamine au sein d'hippocampes sclérotiques humains en RMN liquide. Cette analyse a été associée à une perfusion préalable des patients opérés avec du  $^{13}\text{C}$ -glucose rendant ainsi possible la modélisation du cycle glutamate/glutamine. Cette approche a été reprise et développée par la suite dans des modèles animaux d'ELTM, notamment dans notre équipe pour le modèle lithium-pilocarpine toujours en RMN liquide (Melo et al., 2005). Il

s'agissait d'administrer deux substrats marqués au carbone 13 afin de modéliser les interactions neurones-astrocytes avec le [1-<sup>13</sup>C]-glucose, substrat énergétique utilisé de manière prédominante par les neurones et le [1,2-<sup>13</sup>C]-acétate substrat énergétique spécifique des astrocytes. Ainsi le dernier objectif de ce travail de thèse a été d'implémenter les acquisitions RMN HRMAS pour des échantillons enrichis en carbone 13 et d'appliquer cette méthode de double marquage à l'étude du modèle d'ELTM lithium-pilocarpine.

### **Objectifs**

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les effets des méthodes de prélèvement, de fixation et de conservation des échantillons biologiques cérébraux analysés par RMN HRMAS. Nous avons simulé chez l'animal les conditions de prélèvements opératoires des tissus ayant cours lors de la neurochirurgie de l'épilepsie : prélèvement, fixation et congélation dans l'azote liquide. Cette méthode a pour conséquence un délai d'ischémie et d'inactivation pouvant modifier le métabolome cérébral des pièces opératoires étudiées. Cette méthode a été comparée à une méthode éprouvée de fixation immédiate *in vivo* des métabolites : le recours à un dispositif de microondes pulsées haute énergie.

Le second objectif poursuivi dans ce travail de thèse est d'évaluer la validité du modèle lithium-pilocarpine d'ELTM du point de vue de son métabolome. Ce dernier objectif intègre également l'implémentation de méthodes d'acquisition basées sur des substrats marqués au carbone 13 pour l'étude spécifique des interactions métaboliques neurones-astrocytes. L'enjeu ici est d'une part méthodologique puisqu'il s'agit de mettre au point les séquences d'acquisition RMN HRMAS basées sur les signaux issus du carbone 13 et d'autre part d'évaluer les interactions métaboliques neurones-astrocytes après 5 mois de crises récurrentes spontanées. Ces résultats seront comparés aux travaux précédents de notre équipe (Melo et al., 2005) réalisés selon le même protocole en RMN.

Enfin le troisième objectif est la caractérisation métabolomique des tissus cérébraux issus de la chirurgie de l'épilepsie sur une cohorte d'environ 70 patients souffrant d'ELTM associée à une analyse multivariée des données intégrant des critères neuropathologiques et cliniques. A ce jour aucune étude n'a encore évalué les profils métabolomiques des tissus épileptogènes par RMN HRMAS.

## **Première Section : état de la question**



## 1. La métabolomique

### 1.1 Complexité de la biologie et du vivant : la biologie des systèmes

Une étude pionnière pouvant illustrer le passage de l'étude du métabolisme à celle du métabolome pourrait être celle de Fan et al. (1986) qui dès les années 80 a exploité deux techniques majeures dans le domaine de la métabolomique que sont la spectrométrie de masse (SM) et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Les termes « métabolome » et « métabolomique » sont des néologismes datant de la fin des années 90 et sont apparus dans deux publications : Oliver et al. (1998) et Nicholson et al. (1999). La définition du terme métabolomique est : « *le profil systématique des métabolites et des voies métaboliques dans les organismes entiers par l'étude des biofluides et des tissus* » (Lindon et al., 2003). Dans le même temps est apparu le terme de « métabonomique » qui correspond à l'analyse quantitative des modifications du métabolisme général des organismes résultant de perturbations d'origine pathologique, génétique, nutritionnelle, hormonale ou toxique (Nicholson et al., 2002). La distinction entre ces deux termes reste cependant assez floue. La complexité du vivant associée à des méthodes analytiques puissantes et une volonté d'aboutir à une compréhension intégrative des systèmes biologiques, a notamment permis l'émergence de techniques qualifiées « d'omiques ». Les principales omiques sont la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la lipidomique et la métabolomique. Plus récemment est apparu le terme de fluxomique. Le développement de ces méthodes a été accompagné par la mise en œuvre de nouvelles formes de raisonnement statistique et algorithmique dans le domaine des sciences de la vie.

L'étude intensive d'organismes vivants à un niveau moléculaire a longtemps eu comme croyance tacite la compréhension des règles biologiques complexes. La description intime de certains mécanismes biologiques est essentielle à cette compréhension ; cependant cette approche semble avoir ses limites dès lors qu'une dimension intégrative des processus biologiques est indispensable. Aussi ces trente dernières années une nouvelle approche intégrative a eu un essor important, celle-ci est à présent connue sous le terme de biologie des systèmes. Ce domaine de recherche a pour objet d'intégrer différents niveaux d'information biologique (organites, cellules, réseaux de gènes, de protéines) et d'en étudier les relations et les interactions par modélisation mathématique (Définition extraite de la fiche 61. Santé 2025. « Biologie des systèmes » par François Iris et Manuel Gea. Bio-Modeling Systems). Typiquement il s'agit d'évaluer voire de quantifier les changements dans le génome, le transcriptome, le protéome et/ou le métabolome suite à une perturbation donnée. Ce domaine de recherche a largement bénéficié des méthodes analytiques à haut débit (« *High throughput* ») et de leurs méthodes de traitement de données associées. O'Shea (2012) rappelle ainsi que la

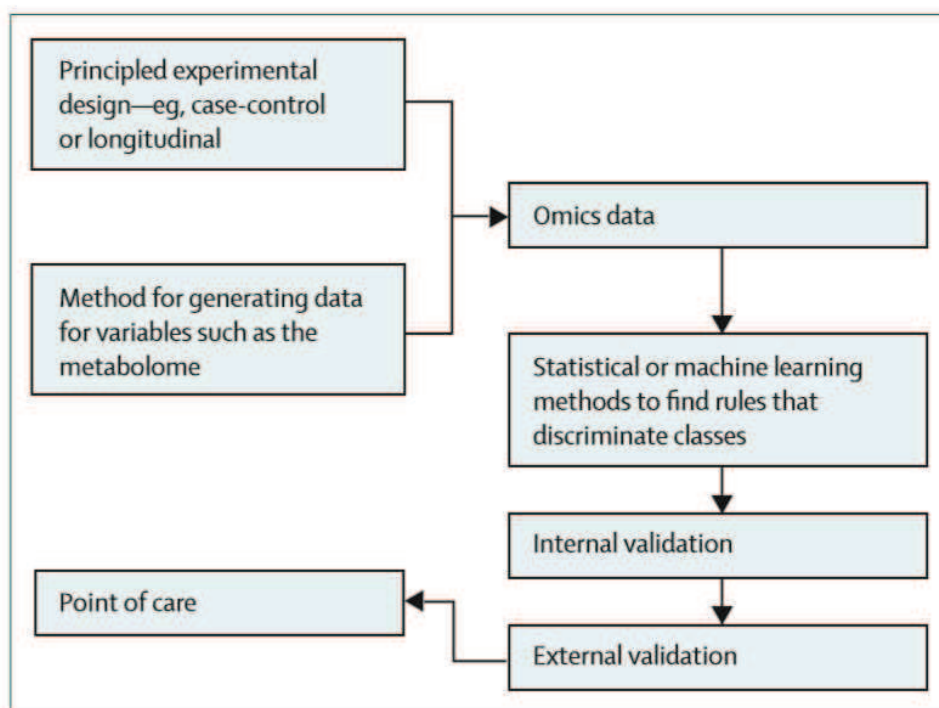
définition de la biologie des systèmes par l'académie royale des sciences médicales de Grande Bretagne est la suivante :

*« Systems biology is a groundbreaking scientific approach that seeks to understand how all the individual components of a biological system interact in time and space to determine the functioning of the system. It allows insight into large amount of data from molecular biology and genomic research, integrated with an understanding of physiology, to model the complex function of cells organs and whole organisms, bringing with the potential to improve our knowledge ».*

La biologie des systèmes adopte ainsi une démarche itérative et intégrative en combinant des approches expérimentales et théoriques dans lesquelles les mathématiques jouent un rôle central (Kell, 2005). La biologie des systèmes peut ainsi être considérée comme le prolongement du concept de biomarqueurs à un niveau de « complexité supérieure ». Dans le domaine médical un biomarqueur peut être utilisé pour le dépistage, le diagnostic, l'évaluation de la réponse ou de la tolérance à un traitement. Un biomarqueur est défini comme une caractéristique mesurable, indicatrice de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponse pharmacologiques à une intervention thérapeutique (Agence National de Sécurité du Médicament, 2013). Le concept de biomarqueur n'est pas nouveau : la glycémie identifiée dès 1848, est un biomarqueur reconnu tant pour caractériser le diabète que pour évaluer l'efficacité des molécules antidiabétiques. La mesure d'un biomarqueur peut correspondre à des procédures simples comme celle de la glycémie ou à des procédures plus complexes comme l'identification d'une mutation spécifique du génome. Ainsi le développement des techniques « omiques » est de s'inscrire dans cette démarche en tenant compte des interactions complexes observables sur un échantillon de composants moléculaires qui considérés un par un ne pourrait être considérés comme un biomarqueur. Ainsi la biologie des systèmes est à une approche holistique non réductionniste.

Le développement important que connaît la médecine dite personnalisée repose en grande partie sur ce type d'approche. Toutefois la place de la biologie des systèmes dans la prise en charge des patients n'est qu'à ses débuts. A défaut de s'appliquer pour l'instant à large échelle, le recours à un certain nombre (limité) de biomarqueurs dans le diagnostic ou le suivi thérapeutique des patients reste la méthode la plus développée. La biologie des systèmes appliquée aux patients a ainsi pour but de multiplier le nombre de biomarqueurs potentiellement analysables (gènes, protéines, métabolites...) et de se référer à des bases de données à l'aide de méthodes statistiques multivariées ou discriminantes. L'hypothèse est qu'en s'intéressant à un système biologique donné, il est d'abord utile de le caractériser puis de le modéliser auprès de sujets qualifiés de « sains ». S'ensuit alors une phase de validation au cours de laquelle des perturbations sont apportées au système. On compare

alors l'état perturbé observable chez un malade à cette base de données. *In fine* cette démarche a pour but de contribuer à une prise en charge personnalisée des patients au sein de leur pathologie (figure 1).



**Figure 1 :** Voie d'émergence pour une application médicale des données issues de différents domaines « d'omics » (Figure issue de O'Shea, 2012).

L'impressionnante accumulation de connaissances acquises dans les domaines des sciences de la vie et en particulier dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire suggère qu'aucune fonction biologique ne peut être attribuée à un unique mécanisme moléculaire. Il est à présent raisonnable de considérer que les caractéristiques intrinsèques de nombreuses fonctions biologiques sont des propriétés émergentes qui apparaissent à un certain niveau de complexité et disparaissent si ce degré de complexité n'est pas atteint. Une telle approche appliquée au domaine de la pathologie épileptique a été publiée pendant le déroulement des travaux de cette thèse sous la forme d'un article de revue décrivant l'impact d'une approche issue de la biologie des systèmes sur la caractérisation de la pathologie épileptique et plus spécifiquement sur la possibilité d'orienter la prise en charge pharmacothérapeutique des patients (Margineanu, 2012).

Le présent travail de thèse n'a pas pour ambition de développer une thématique spécifique sur la biologie des systèmes et encore moins d'aboutir à une application chez des patients épileptiques.

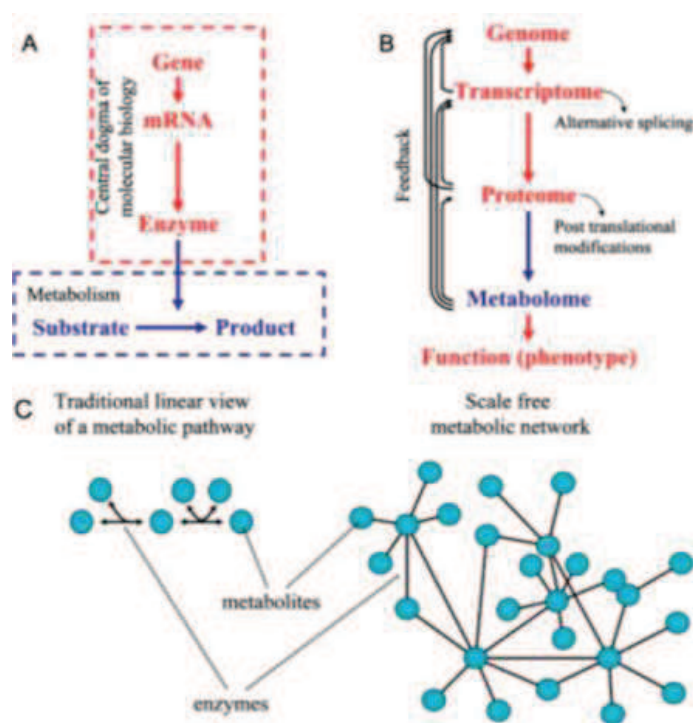
Toutefois notre volonté est de nous inscrire résolument dans ce type d'approche qui n'en est qu'à ses débuts. En effet deux éléments moteurs sont à l'origine de notre travail :

- Le premier est que la biologie des systèmes permet parfois d'aborder une pathologie sous un angle nouveau dans l'étude et la compréhension de sa physiopathologie.
- Le second est qu'il est nécessaire au préalable de réaliser un patient travail descriptif quel qu'en soit le niveau physiologique : génome, protéome, métabolome chez l'homme ou dans des modèles animaux.

### 1.2 Place de la métabolomique au sein des « omics »

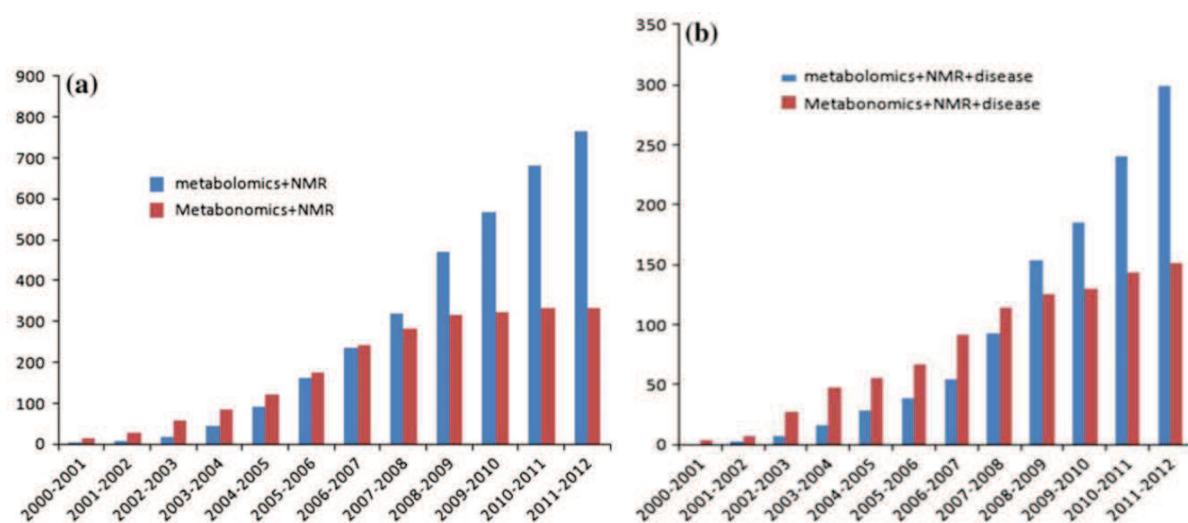
La génétique a pour objet d'analyser la structure du génome, de séquencer les gènes, d'en étudier les interactions au sein de la machinerie cellulaire et d'éventuellement identifier la fonction. A la suite du séquençage exhaustif du génome humain, les quantités de données disponibles n'ont par la suite pas permis la compréhension intime de nombreux systèmes biologiques même si des avancées importantes ont abouti. Il s'en est suivi la période post-génomique ou génomique fonctionnelle ayant pour but de caractériser pour chaque gène les informations utiles aux biologistes. Une discipline entière est née de ce besoin, la transcriptomique, qui est l'étude de la transcription de l'ADN en ARN (deuxième étape de la génomique). Les premières analyses du transcriptome avec des puces à ADN ont notamment établi des profils d'expression rencontrés pour certains types cellulaires. Cependant les effecteurs de ces modulations d'expression restent majoritairement inconnus. C'est en 1995 que pour la première fois le terme de protéome a été employé (Wasinger et al., 1995).

Pendant longtemps a persisté l'idée d'un flux unidirectionnel de l'information depuis le gène jusqu'à la protéine. Il est à présent admis que cette vision de la biologie cellulaire est obsolète du fait de nombreuses rétroactions. A ce titre le schéma proposé par Hollywood et al., en 2006 est parlant (figure 2). Aujourd'hui la métabolomique apparaît non seulement complémentaire à d'autres techniques omiques mais apparaît peut-être comme l'approche reflétant le mieux le phénotype. En effet les flux métaboliques sont non seulement régulés par l'expression des gènes mais également par les processus post-transcriptionnels.



**Figure 2 :** (A) Vision initiale de la biologie moléculaire pour laquelle le flux d'information va du gène à la protéine (B) Vision générale des « omiques » où le flux d'information va du gène aux métabolites accompagné des nombreuses boucles de rétrocontrôle ; les métabolites sont considérés comme les derniers effecteurs de ce flux d'information qui abouti aux fonctions biologiques au sens large, celles-ci contribuant de façon déterminante au phénotype observé. (C) A gauche, vision linéaire initiale des voies métaboliques ; à droite représentation non linéaire les points représentent les métabolites, les connections les enzymes (figure issue de Hollywood et al., 2006).

Les articles de revues dédiés à la métabolomique distinguent quatre stratégie d'approches (Goodacre et al., 2004 ; Hollywood et al., 2006): (i) le dosage de métabolites cibles pour l'étude d'une voie métabolique particulière (ii) l'évaluation d'un profil métabolique particulier par l'étude d'un groupe de métabolites en lien avec un processus ou une voie biologique spécifique (iii) une analyse quantitative, qualitative et exhaustive du métabolome d'un échantillon selon des conditions expérimentale définies (iv) un profilage métabolique permettant la classification d'un échantillon, il s'agit moins d'avoir des informations spécifiques sur les métabolites eux-mêmes mais plutôt de caractériser l'empreinte métabolomique afin de la confronter un à modèle de classification. Ces approches ne sont pas exclusives entre elles. La figure 3 ci-dessous illustre l'évolution du nombre de publications depuis 2000 dans le domaine de la métabolomique.

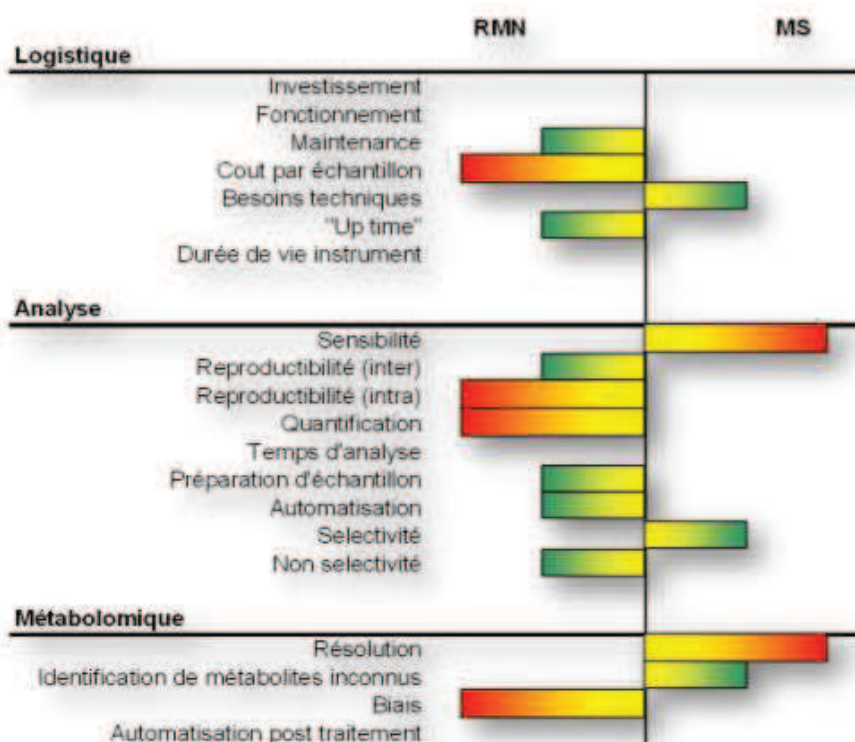


**Figure 3 :** Nombre de publications depuis 2000 issues de l'application «*web of knowledge*» (<http://apps.webofknowledge.com>) avec les mots clés suivant : (a) metabolomics+NMR, metabonomics+NMR ; (b) metabolomics+NMR+disease, metabonomics+NMR+disease. D'après Abdul-Hamid et al., 2013.

Par ailleurs en pratique la métabolomique a pour tendance la multiplication de variables pour décrire un seul et unique échantillon. Ainsi les mesures effectuées prennent souvent la forme de tableaux où chaque ligne correspond à une observation (ou un échantillon) et chaque colonne à une variable ou covariable. Ce type d'approche génère ainsi une quantité de données importante et souvent complexe à traiter. La métabolomique dans les sciences de la vie s'est ainsi inspirée de méthodes de traitement et de statistiques utilisées notamment dans une discipline connexe : la chimiométrie (Trygg et al., 2007). Bien que le nombre de métabolites présents dans le corps humain ne soient à l'heure actuelle pas déterminé, il est généralement admis que ce nombre est inférieur aux nombres de gènes (environ 20 000), de facteurs de transcription (environ 30 000), de protéines (plus de 100 000). Ce nombre est actuellement estimé entre 3 500 et 10 000 d'après le récent projet HMP (« *Human Metabolome Project* » ; Wishart et al., 2007). A ce jour 309 métabolites ont été identifiés dans le liquide céphalorachidien, 4 229 dans le sérum (Psychogios et al., 2011), 458 dans les urines et environ 300 dans les autres tissus et biofluides.

### 1.3 Techniques mises en œuvre.

Les métabolites sont des espèces labiles dont les structures peuvent être très différentes et la localisation le plus souvent ubiquitaire. Il est à présent possible de mesurer de façon robuste et reproductible des dizaines voire des centaines de métabolites simultanément dans un unique échantillon. Cependant les structures chimiques de ces métabolites ne sont pas encore décrites de façon exhaustive. Différentes méthodes analytiques sont utilisées: la spectroscopie infrarouge (Rehman et al., 2012), la spectrométrie de masse (SM, Lin et al., 2013) couplée ou non à la chromatographie liquide haute performance (Agnolet et al., 2012) et la RMN. La SM et la (RMN) sont les techniques les plus utilisées depuis le début des années 70. La sensibilité de la SM est supérieure au prix d'une étape préalable de traitement des échantillons (extraction ou préparation spécifique). Les avantages de la RMN sont une excellente reproductibilité, une simplicité d'usage et la possibilité de travailler sur des échantillons intacts dès lors que l'on travaille à l'angle magique (cf section suivante). La figure 4 ci-dessous issu de Robertson (2005) compare les deux techniques. Il est à noter que certaines évolutions techniques permettent d'anticiper une meilleure sensibilité de la RMN : développement de sonde cryogénique (Keun et al., 2002), augmentation du champs magnétique (Gruetter et al., 1998) et enfin la polarisation nucléaire dynamique (DNP ; Harris et al., 2011).



**Figure 4.** Comparatif entre RMN et MS pour leur application en métabolomique (figure issue de Erb, 2008 adaptée de Robertson, 2005)

## 1.4 Applications de la métabolomique en Neurosciences

Dès 1977, Ekstrand fut l'un des premiers à avoir recours à la RMN pour l'étude du métabolisme cellulaire (Ekstrand et al., 1977). Il s'agissait d'étudier, dans une suspension cellulaire de globules rouges, les temps de relaxation de métabolites tels que le lactate, le pyruvate, l'alanine, ou la créatine. C'est en 1983 que Behar et al. (1983) ont réalisé la première acquisition d'un spectre RMN *in vivo* du proton à l'aide d'un spectromètre 8,5 T sur un cerveau de rat. Les premiers travaux sur l'usage de la RMN chez l'homme datent également des années 80 (Bottomley et al., 1985). En 1988, Hanstock et son équipe ont pu mettre en évidence les signaux associés à des métabolites d'intérêt tels que la choline, la créatine, le N-acétylaspartate, le glutamate, la glutamine, le GABA et le lactate. Ces métabolites restent aujourd'hui encore les métabolites les plus observés compte-tenu des champs magnétiques relativement modestes compatibles avec une application chez l'homme (classiquement 1,5 à 3 Tesla). Le cerveau est l'organe faisant l'objet du plus grand nombre d'étude par spectroscopie RMN essentiellement du fait de sa relative homogénéité tissulaire et de mouvements cardiobalistiques raisonnables. La contribution de cette technologie à l'étude de la physiopathologie de nombreuses neuropathologies est à présent reconnue : neurooncologie essentiellement mais également sclérose en plaque, épilepsie, démence, maladie d'Alzheimer... Des études RMN dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ont obtenu des résultats intéressants. La SLA est une maladie neurodégénérative dont l'issue est fatale par complication respiratoire le plus souvent du fait d'une dégénération des neurones situés dans la corne ventrale de la moelle épinière. Les mécanismes physiopathologiques restent peu connus et il n'existe actuellement aucun marqueur biologique de l'évolution de la maladie. Blasco et al. (2010) ont comparé le liquide céphalorachidien (LCR) de patients atteints de SLA au LCR de patients exempts de maladie neurodégénérative. Les auteurs rapportent une diminution de la concentration en acétate dans le groupe « contrôle » et une augmentation significative d'acétone, pyruvate et ascorbate dans le groupe SLA. Autre exemple, la schizophrénie a une prévalence comprise entre 0,3 et 0,7%. Il n'existe actuellement aucune contribution biologique majeure au diagnostic de schizophrénie. Plusieurs études métabolomiques ont été conduites dont certaines couplées à des analyses transcriptomiques et protéomiques dont celle de Prabakaran et al. (2004). Le résultat majeur de cette étude réalisée sur du cortex frontal de patients schizophrènes et de patients « contrôles » indique que les anomalies observées sont essentiellement en lien avec des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et le stress oxydatif. Cette base analytique permettait de distinguer 90% des patients schizophrènes du groupe contrôle. Enfin Kork et al. (2009) ont effectué une analyse RMN sur du LCR de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.



## 2. La Résonance Magnétique Nucléaire Haute Résolution à l'Angle Magique (RMN HRMAS)

### 2.1 Historique de la Résonance Magnétique Nucléaire

La découverte de la RMN dans la matière condensée est attribuée à deux équipes à la fin de l'année 1945 : Purcell, Torrey et Pound à Harvard ; Bloch, Hansen et Packard à Stanford. Cette découverte découlerait de la volonté de ces équipes de pouvoir mesurer précisément les moments magnétiques de différents noyaux avec comme espoir de faire progresser les connaissances en physique nucléaire. Peu de temps auparavant, Isador I. Rabi développa les premières méthodes permettant la mesure des propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques et obtint le prix Nobel en 1944. L'article de Maurice Goldman (2004) rapporte les éléments chronologiques de l'histoire de la RMN. Les étapes significatives ont été l'élaboration des équations de Bloch utile pour la description de la RMN liquide ; la compréhension des phénomènes de relaxation dans les liquides par les théories de Bloembergen, Purcell et Pound en 1948 et Salomon en 1955 ; la découverte théorique de l'effet Overhauser dans les métaux en 1953 décrivant l'effet d'augmentation de la polarisation des spins nucléaires lorsque l'on sature la résonance des électrons de conduction ; la théorie des échos de spins par Hahn en 1949. Une découverte fortuite fondamentale, par deux équipes (Proctor et Yu ; Dickinson) a été celle du déplacement chimique (« chemical shift »). Maxwell et Hahn ont par ailleurs révélé la sensibilité de la fréquence de résonance à l'environnement électronique des noyaux permettant ainsi de faire de la RMN un outil majeur de la chimie analytique structurale. Ces développements méthodologiques sont alors accompagnés du développement commercial de spectromètres et de l'apparition des premiers ordinateurs. Ainsi en 1961, la firme Varian sort le spectromètre A60 devenu un outil prisé en chimie analytique. Le premier spectromètre à aimant supraconducteur est développé par la même firme en 1964. A partir de 1966, Ernst à Zurich développe la méthodologie des transformées de Fourier pour les molécules en solution. En 1972, la société Bruker commercialise le premier spectromètre entièrement dédié aux impulsions (abandon des méthodes continues) et à la transformée de Fourier. Dans la même période, Jeener (1971) présente l'idée de la réalisation de la spectroscopie à deux dimensions dans les liquides. Suit alors un article fondamental de Aue, Bartholdi et Ernst (1976) décrivant tout une panoplie de concepts et de méthodes pour ce type d'expérience avec des illustrations expérimentales. A la fin des années 70 et au début des années 80 un développement important apparaît grâce à la mise sur le marché de spectromètres de plus en plus élaborés avec des fréquences de plus en plus élevées pour augmenter la résolution spectrale et la sensibilité avec comme corollaire le support d'ordinateurs de plus en plus

puissants. Ces progrès technologiques rendent possible le développement de nombreuses applications issues des travaux fondamentaux des décennies précédentes.

## 2.2 Principes théoriques de la RMN HRMAS

Le principe de la spectroscopie RMN du proton est largement décrit dans la littérature (Macomber, 1998). Il en va de même de celle du carbone 13 (Breitmaier and Volter, 1989). Le lecteur trouvera ci-après les notions élémentaires pour aborder cette technique d'un point de vue applicatif. La spectroscopie RMN (SRMN) est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$ , par exemple). Cette technique est particulièrement bien développée pour la RMN du proton essentiellement pour trois raisons : (i) sa quantité importante dans la nature (ii) son abondance isotopique naturelle élevée (99,98%) (iii) son rapport gyromagnétique avantageux. Une façon de définir au sens commun les techniques spectroscopiques de manière générale serait la suivante : il s'agit d'enregistrer des interactions entre le rayonnement électromagnétique et la matière (biologique ou non), l'information étant représentée par un spectre d'absorption (ou plus précisément de résonance dans le cas de la RMN) dont l'intensité dépend de la fréquence d'émission. Les atomes disposés dans un champ magnétique acquièrent un mouvement de précession noté  $\nu$ . La relation de Larmor relie la fréquence de précession  $\nu$  à l'intensité du champ magnétique auquel les atomes sont soumis :

$$\nu = G \cdot B_0 / 2 \pi$$

avec  $G$  représentant le rapport gyromagnétique du noyau considéré ( $\gamma = 42,58 \text{ MHz} \cdot \text{T}^{-1}$  pour le proton et  $\gamma = 10,71 \text{ MHz} \cdot \text{T}^{-1}$  pour le carbone 13).  $B_0$  étant la valeur en Tesla du champ magnétique principal. Les éléments essentiels de la RMN sont :

- l'échantillon analysé
- un aimant qui génère le champ principal  $B_0$
- l'antenne radiofréquence (RF) qui résonne à la fréquence de Larmor
- une console permettant le contrôle de l'impulsion RF émise, la démodulation et l'amplification du signal reçu.

Dans le champ magnétique principal les spins de l'échantillon précessent à la fréquence de Larmor. Le signal RMN provient alors de la différence de population entre les deux états de spins possibles à l'équilibre thermique (équation de Boltzmann). L'impulsion radiofréquence (RF) via l'antenne excitatrice crée transitoirement un champ magnétique oscillant à la fréquence de Larmor entraînant une bascule de l'aimantation dans le plan transverse. Cette aimantation dépend ainsi de la séquence des impulsions et des propriétés de résonance de l'échantillon. L'antenne réceptrice recueille les signaux issus de ce basculement. Le signal est amplifié puis démodulé afin d'obtenir le signal RMN, le Free Induction Decay (FID) ou un écho (généralisé par une séquence d'impulsion RF et/ou par application de gradients). Les signaux recueillis permettent de remplir le plan de Fourier codé en fréquence et en phase.

De façon macroscopique il est accepté de considérer la RMN comme une méthode peu sensible. En effet il est nécessaire de mettre en jeu un grand nombre de spins pour obtenir un signal détectable. Le signal des noyaux d'hydrogène, présents en grande quantité dans les tissus biologiques permettent d'obtenir des signaux de très bonne qualité. Les limitations en termes de sensibilité et de résolution peuvent être corrigées par l'usage de spectromètres à haut champ équipés de sondes plus sensibles. Toutefois même à haut champ des limitations peuvent influencer la résolution spectrale du fait de multiples mécanismes d'élargissement de raies inhérents à la nature hétérogène de l'échantillon biologique. Les trois mécanismes principaux à l'origine de ces élargissements sont le couplage dipolaire (direct et indirect), quadripolaire et les différences de susceptibilité magnétique hétérogène au sein des échantillons biologiques. Une technique RMN, initialement développée par deux équipes, Andrew et Newing (1959) et Lowe (1959), a montré la possibilité de moyenniser les différents mécanismes d'élargissement de raies afin d'acquies avec succès des spectres de haute résolution sur des tissus biologiques (Cheng et al., 1996). A l'origine l'enjeu était de pouvoir faire l'acquisition de signature spectrale exploitable dans des échantillons solides (poudre notamment). Deux paramètres physiques essentiels appliqués aux échantillons à analyser rendent ces acquisitions possibles : l'inclinaison de l'échantillon à  $54,7^\circ$  et une rotation de l'échantillon à haute fréquence. Cet angle correspond à ce qu'il est commun d'appeler l'angle magique. En 1972, Chapman et al. (1972) sont les premiers à montrer que la rotation à l'angle magique permet d'améliorer sensiblement la résolution de spectres  $^1\text{H}$  de lécithines en suspension aqueuse. Daskocilova et al. (1975) ont utilisé la RMN solide pour montrer dans un milieu hétérogène simple (des billes de verres placées dans un solvant) la possibilité de diminuer les effets de susceptibilité magnétique par l'inclinaison de l'échantillon. Cheng et al. (1996) sont ensuite les premiers à avoir effectué des acquisitions à l'angle magique sur des tissus biologiques (nodules lymphatiques).

Dès lors que des spins nucléaires sont introduits dans un champ magnétique  $B_0$  ils subissent des perturbations de deux ordres : (i) externes, celles liées à la présence du champ magnétique (effet Zeeman) ; (ii) internes, celles propres au système de spins (le champ modifiant les types d'interactions entre les spins nucléaires). Dans la théorie du magnétisme quantique, l'hamiltonien de Heisenberg décrit les moments magnétiques localisés en interaction. Pour un système de spins donné l'ensemble des hamiltoniens à considérer sont les suivants :

$$H = H_Z + H_J + H_D + H_{CSA} + H_Q \quad (\text{équation 1})$$

$H$  : hamiltonien total

$H_Z$  : hamiltonien Zeeman

$H_J$  : hamiltonien du couplage scalaire

$H_D$  : hamiltonien dipolaire

$H_{CSA}$  : hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique

$H_Q$  : hamiltonien quadripolaire

En milieu isotrope seuls les déplacements chimiques et les couplages scalaires  $J$  interviennent dans le signal détecté. Par contre en milieu anisotrope d'autres interactions sont à prendre en compte :

- Les interactions dipolaires ( $H_D$ )
- Les différences de susceptibilités magnétiques ( $H_Z$ )
- L'anisotropie de déplacement chimique ( $H_{CSA}$ )
- Les interactions quadripolaires ( $H_Q$ )

L'enjeu de la réalisation d'acquisition dans les conditions MAS est donc d'éliminer au maximum ces phénomènes à l'origine d'un élargissement des raies spectrales ayant pour conséquence une faible résolution du signal. Les conditions MAS permettent d'obtenir un moyennage des effets des différentes interactions (Garroway, 1982).

**Les interactions dipolaires directes:** deux spins couplés donnent lieu à une variation d'énergie de leur état quantique respectif et par conséquent modifient leurs résonances. Dans la mesure où l'ensemble des spins n'a pas la même valeur et n'est pas orienté de la même façon dans le champ  $B_0$  (figure 5) un dédoublement du signal détecté peut apparaître. Il s'agit d'un déplacement des niveaux d'énergie produisant un éclatement dipolaire avec apparition d'un doublet unique pour chacun des spins. La valeur de l'éclatement est donnée en Hz par :

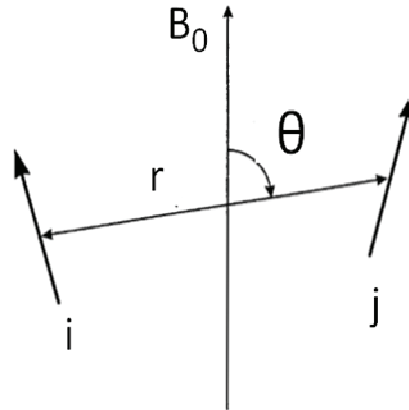


Figure 5. Couplage spin-spin (ij) dans un champs magnétique  $B_0$ .

$$\Delta v_{ij} = kD_{ij} (3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) \quad (\text{équation 2})$$

$$kD_{ij} : \text{constante dipolaire} \left( D_{ij} = - \frac{\mu_0 h}{4\pi} \frac{\gamma_i \gamma_j}{r_{ij}^3} \right) \quad (\text{équation 3})$$

$\mu_0$  : perméabilité magnétique du vide

$\gamma_i, \gamma_j$  : rapports gyromagnétiques des noyaux i et j

$\theta_{ij}$  : orientation du vecteur internucléaire

$r_{ij}$  : distance entre les noyaux i et j

En phase liquide, l'angle  $\theta$  est moyenné à zéro du fait du mouvement brownien (réorientation rapide et aléatoires des molécules). En phase solide l'angle ne varie pas et les couplages dipolaires deviennent les interactions principales d'où un effet sur la largeur des raies. Ainsi pour éliminer le couplage dipolaire il est nécessaire de ramener le terme  $(3 \cos^2 \theta_{ij} - 1)$  à zéro soit  $\theta_{ij} = 54,74^\circ$  ce qui correspond à l'angle magique appliqué en RMN HRMAS.

**Couplage indirect** : lorsqu'une liaison chimique existe les spins sont tout de même couplés via les électrons (couplage scalaire ou indirect). Ce couplage est à la base de la détermination des structures moléculaires (couplage J). Ce couplage est représenté par le terme  $H_J$  dans l'équation 1.

**L'anisotropie de déplacement chimique** : lorsqu'une molécule est placée dans un champ magnétique des courants d'électrons sont induits dans diverses orbitales moléculaires. Des moments magnétiques sont induits par cette circulation des électrons, lesquels vont s'opposer proportionnellement à l'action du champ (effet de « blindage » ou « d'écran »). Dans la majeure partie des cas, les électrons n'ont pas une distribution sphérique autour du noyau. Cette distribution dépend de la géométrie de la molécule, il en résulte que le déplacement chimique est anisotrope. Chaque noyau possède ainsi un environnement chimique propre qui peut influencer la fréquence de résonance. On parle alors de déplacement chimique. Dans les solutions liquides, du fait du mouvement brownien, les réorientations moléculaires permanentes permettent de négliger cette anisotropie. Ainsi le champ effectif ( $B_{\text{eff}}$ ) est :

$$B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \bar{\sigma}) \quad (\text{équation 4})$$

$\bar{\sigma}$  : constante d'écran

Ainsi le signal obtenu n'est plus un signal fin, mais la somme d'un ensemble de signaux fins caractéristiques de chaque orientation. Le déplacement chimique est fonction de deux termes :

$$W_{\text{ca}}(\theta, \phi) = -\omega_0 \sigma_{\text{iso}} - \frac{1}{2} \omega_0 \Delta (3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi) \quad (\text{équation 5})$$

Isotrope

Anisotrope

En phase solide la valeur est fonction de  $(3 \cos^2 \theta - 1)$  qui s'annule lorsque  $\theta = 54,7^\circ$ .

**La susceptibilité magnétique** : en présence d'une excitation magnétique, les différents moments magnétiques électroniques ou nucléaires vont se diviser en différents niveaux d'énergie. Pour le noyau d'hydrogène caractérisé par un spin de valeur  $\frac{1}{2}$ , l'aimantation peut prendre deux positions dites parallèle ou anti-parallèle. L'état parallèle étant de plus basse énergie il est plus peuplé et il en résulte une aimantation macroscopique notée M. Dans le cas d'un milieu isotrope, l'aimantation  $M_0$  est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique externe  $H_0$ . On peut noter :

$$\vec{M}_0 = \chi_m \cdot \vec{H}_0 \quad (\text{équation 6})$$

Dans le cas d'un milieu anisotrope, la susceptibilité magnétique n'est pas la même dans toutes les directions d'où une inhomogénéité de champ et un élargissement du signal de résonance. Ainsi les susceptibilités magnétiques sont dépendantes de la nature de l'échantillon. Pour un échantillon anisotrope par exemple, l'ensemble des régions peuvent avoir différentes susceptibilités magnétiques. Pour chaque région le champ magnétique externe efficace est alors représenté à la fois par le champ magnétique externe  $H_0$  et par une contribution provenant des susceptibilités magnétiques macroscopiques donnée par la relation :

$$\Delta H = \left( \frac{4\pi}{3} - \alpha \right) X_v H_0 \quad (\text{équation 7})$$

$X_v$  : Susceptibilité du volume  $V$  ;  $\alpha$  : facteur dépendant de la forme de l'échantillon

Les variations de susceptibilité magnétique peuvent être écrites selon l'équation :

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{H_0} = \frac{4\pi X_v (3k-1)}{3} \times \frac{3 \cos^2(\theta) - 1}{2} \quad (\text{équation 8})$$

$K$  : facteur géométrique ;  $\theta$  : angle entre la direction de l'axe du moment magnétique et le champ magnétique  $B_0$ .

Par conséquent les variations de susceptibilité magnétique peuvent être minimisées lorsque  $\theta = 54,7^\circ$  ramenant ainsi le deuxième terme de l'équation à 0. Enfin l'homogénéité du champ est également optimisée à chaque expérience grâce à des bobines correctrices (dites bobines de « shim » ; Chmurny et al., 1990).

**Les interactions quadripolaires** : ces interactions existent pour les isotopes de spin égal ou supérieur à 1. Un moment quadripolaire électrique existe (en plus du moment magnétique nucléaire) du fait d'une anisotropie des charges dans le noyau. Les interactions quadripolaires sont d'autant plus importantes que l'atome possède beaucoup d'électrons. En effet plus les électrons sont nombreux plus le gradient de champ électrique qui en résulte est important et plus l'interaction avec le noyau est grande entraînant ainsi des variations de l'état quantique des noyaux. Le couplage quadripolaire est moyenné grâce à la rotation à l'angle magique.

Par ailleurs, des membres de notre équipe s'intéressent depuis la fin des années 90 à l'amélioration constante des techniques d'acquisition en condition MAS et de nombreux travaux ont été publiés

dans ce domaine : optimisation des inhomogénéités de champs magnétiques (Elbayed et al., 2005), optimisation des méthodes de résolutions spectrales (Piotto et al., 2005), études des couplages dipolaires dans les protéines pour différents angles d'acquisition (Lancelot et al., 2004), étude des anomalies de susceptibilité magnétique (Elbayed et al., 1999).

### ***Les séquences d'impulsions***

**Acquisition  $^1\text{H}$  1D.** Bien que la plupart des séquences d'impulsions en RMN HRMAS découlent des applications réalisées en RMN liquide, certaines spécificités doivent être optimisées. Les échantillons biologiques ont une forte teneur en eau. Afin de pouvoir distinguer un métabolite il est nécessaire que l'intensité de signal issu des protons de l'eau soit au maximum  $10^6$  fois plus importante que son signal propre. Ainsi la diminution du signal de l'eau a pour but d'augmenter la sensibilité de détection. L'eau par ailleurs peut être à la base d'un échange d'aimantation avec d'autres molécules. Dans les applications RMN HRMAS, la technique de présaturation de l'eau est couramment utilisée pour permettre cette diminution de signal. Il existe de nombreuses techniques documentées permettant cette diminution. Toutefois ces techniques ont fait l'objet de nettement moins de publications que dans le cadre de la RMN liquide (Chen et al., 2004). Notre équipe a pu tester un certain nombre de séquences de suppression de l'eau et étudier leur conséquence sur les profils métaboliques détectés. Les séquences testées ont été les suivantes : SEEN (Selective Excitation to Empirically Null), PURGE (Presaturation Utilizing Relaxation Gradients), WATERGATE (WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation). Ce travail est décrit dans un précédent travail de thèse de notre équipe (Erb, 2008). La séquence CMPG permet une acquisition sélective des métabolites de faible poids moléculaire. La séquence a été optimisée afin de choisir le délai inter-impulsion  $\tau$  de telle sorte à diminuer la distorsion introduite par le couplage scalaire homonucléaire en synchronisant la fréquence avec la vitesse de rotation.

**Acquisition  $^1\text{H}$  2D.** Les séquences 2D (Aue et al., 1976) servent essentiellement de moyen d'identification pour l'attribution des résonances et ainsi identifier les molécules difficilement identifiables sur les spectres 1D (résolution insuffisante, recouvrement, etc...). De nombreuses séquences ont fait leur preuve en RMN liquide essentiellement en chimie analytique. Les séquences utilisées en RMN HRMAS sont identiques. De nombreuses séquences RMN 2D ont été mise au point, on distingue deux grands groupes : les séquences de corrélation homonucléaires et les séquences de corrélations hétéronucléaires. Parmi ces séquences on peut citer celles mettant en jeu les corrélations via le couplage scalaire : séquence COSY (Aue et al., 1976), TOCSY (Bax and Davis, 1985). Ces séquences n'ont pas été utilisées dans le présent travail de thèse. Parmi les séquences



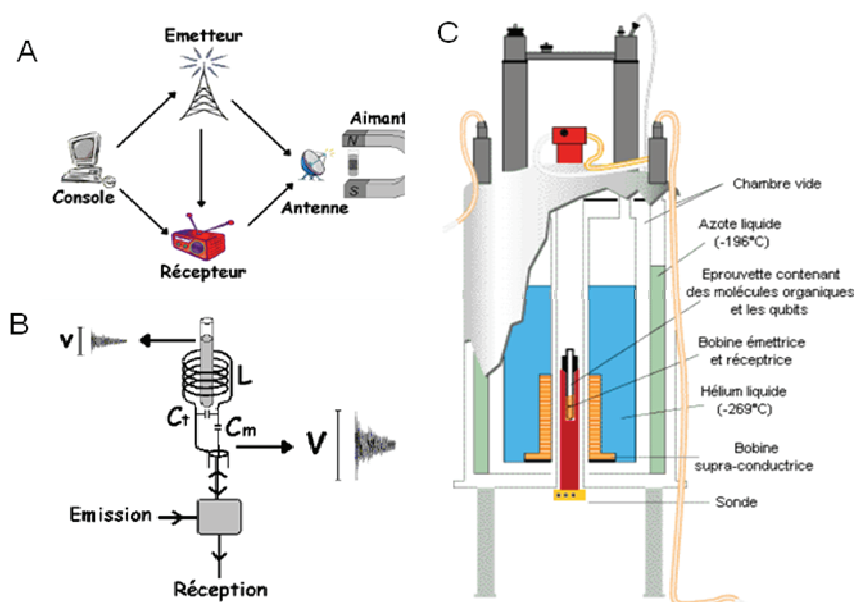
hétéronucléaires citons la séquence HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). Cette séquence a été développée au début des années 80 (Bodenhausen and Ruben, 1980) et a été employée dans nos travaux. La séquence HSQC  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  permet la détection des corrélations entre  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  en dispersant l'information de résonance sur deux noyaux nucléaires voisins. Cette séquence utilise des gradients pulsés. Le spectre obtenu est bidimensionnel, un axe correspondant au signal RMN du proton et l'autre axe à l'élément hétéronucléaire  $^{13}\text{C}$ . Chaque pic apparaissant sur une cartographie 2D correspond à un couple  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ . Ainsi, si le déplacement chimique du proton est connu, il est possible de déterminer le déplacement chimique de l'hétéroatome associé. Cette séquence est possible au prix d'une relativement longue période d'acquisition compte tenu à la fois de l'abondance isotopique naturelle du carbone 13 et de son rapport gyromagnétique moins favorable que celui du proton.

**Quantification.** Du fait d'un besoin d'accumulation des signaux inhérent à la technique RMN, de l'imprédictibilité des spectres et de leur ligne de base, cette technique peut parfois être considérée comme une technique pour laquelle la quantification absolue reste discutée. Toutefois sous certaines conditions cette limitation méthodologique peut être acceptable. La concentration pour un métabolite donné est proportionnelle à l'intensité de signal obtenu sur un spectre 1D  $^1\text{H}$ . Ainsi l'aire sous la courbe d'un pic donné sera proportionnelle à la concentration du métabolite étudié. Une manière classique d'aborder cette question est de recourir à des étalons externes ou internes. Une correction doit ensuite être apportée en fonction du nombre de protons issus du signal observé pour un métabolite donné (fonction  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  ou autre). Toutefois en RMN HRMAS plusieurs biais méthodologiques peuvent survenir selon le type d'acquisition. Tout d'abord une mauvaise présaturation du signal de l'eau est potentiellement à l'origine d'un manque de sensibilité. Par ailleurs la multitude de raies spectrales présentes sur certains spectres acquis rendent parfois nécessaire le recours à des techniques de déconvolution des signaux observés. Il s'agit d'extrapoler le signal d'un métabolite donné afin d'isoler son aire sous la courbe par rapport aux signaux adjacents. Il est alors possible de recourir à des logiciels de type LC Model par exemple (Provencher, 1993 ; 2001). Ce problème peut toutefois être minimisé dans les cas où la résolution des spectres est suffisante permettant ainsi de bien séparer les signaux observés. C'est cette méthode qui a été retenue dans nos travaux dans la mesure où il nous est possible de quantifier de façon robuste entre 15 et 20 métabolites sur l'ensemble des métabolites détectés au sein des spectres acquis. On peut signaler ici que notre spectromètre est également équipé d'une méthodologie de quantification électronique implémentée par le fabricant Bruker connu sous le nom d'ERETIC et largement utilisée par ailleurs (Akoka et al., 1999). Enfin il faut rappeler ici que la démarche d'une analyse

métabolomique est bien moins de quantifier de façon absolue tous les métabolites observables que de fournir des données sur les profils métaboliques des échantillons analysés.

### 2.3 Equipements RMN HRMAS

Le dispositif général en terme d'équipement est représenté sur la figure 6 ci-dessous.



**Figure 6.** Dispositif général d'un spectromètre. (A) Un spectromètre RMN est composé : d'un aimant qui génère le champ magnétique, d'une chaîne d'émission qui produit les impulsions RF, d'une bobine qui transmet ces impulsions à l'échantillon et recueille le signal, d'une chaîne de réception qui amplifie ce signal et d'un ordinateur qui gère l'ensemble (d'après S. AKOKA, Université de Nantes). (B) L'antenne est chargée d'émettre les impulsions RF et de recevoir le signal RMN. C'est un circuit résonant qui transforme la tension  $v$  produite par l'échantillon en une tension beaucoup plus importante  $V$  ;  $C_t$  est la capacité d'un condensateur ajustable dont la valeur doit être réglée pour chaque échantillon pour que la fréquence d'accord coïncide avec la fréquence de Larmor (« tuning ») ; Un condensateur variable  $C_m$  permet de réaliser l'adaptation d'impédance (« matching ») de la sonde (d'après S. AKOKA, Université de Nantes). (C) Vue en coupe d'un spectromètre liquide (d'après E. QUIVET, Université de Marseille).

Dans le cadre de notre travail, les acquisitions ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER Avance III de 500 MHz installé au sein du service d'anatomopathologie de l'hôpital de

Haute-pierre (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ; figure 7). Le spectromètre est équipé d'une sonde de 4 mm à double résonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et d'un canal deutérium ( $^2\text{H}$ ) utilisé comme signal de référence pour compenser la dérive du champ principal (« lock »).



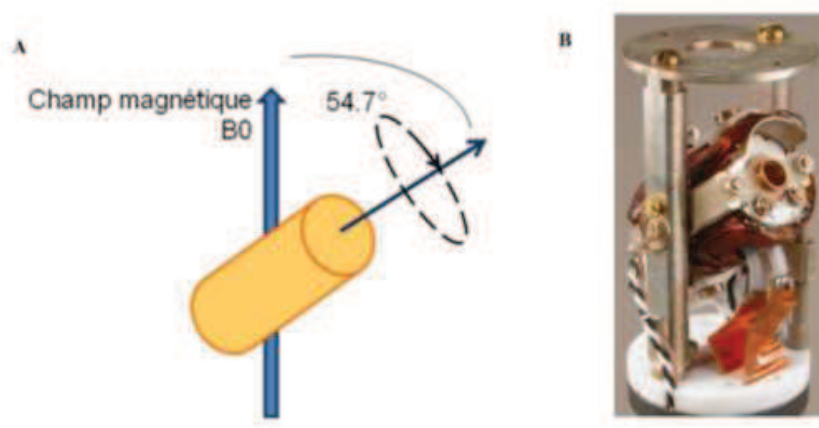
**Figure 7.** Installation de notre spectromètre BRUKER Avance III (500 MHz)

Le spectromètre possède également une unité de refroidissement (Bruker Cooling Unit ; BCU) permettant de maintenir l'échantillon biologique analysé à une température fixée, généralement autour de  $0^{\circ}\text{C}$ , afin de limiter les variations biochimiques au cours de l'acquisition. La vitesse de rotation de l'échantillon peut varier selon les protocoles d'acquisition de 2 à 5 KHz. Nous avons fixé cette vitesse à 3502 Hz. Le système de refroidissement participe ainsi au refroidissement de l'échantillon du fait de la rotation. Il s'agit là d'un enjeu méthodologique majeur pour cette technique car l'absence d'effet de la rotation sur la composition en métabolites des tissus analysés reste un sujet débattu dans la littérature. Alors que des équipes font état d'une absence d'effet (Cheng et al., 1998), d'autres équipes dont nous faisons partie évoque la possibilité d'un effet de variations biochimiques au sein des échantillons (Opstad et al., 2008 ; Detour et al., 2011).

La sonde HRMAS est composée de deux parties : la connectique (figure 8) et la tête de mesure intégrant le stator et les antennes d'émission-réception (figure 9).



**Figure 8.** Partie connectique de la sonde HRMAS, (a) canal proton  $1H$ , (b) canal carbone  $13C$ , (c) canal deutérium  $2H$ , (d) réglage de l'angle magique, (e) réglage des antennes RF, (f) chauffage, (g) mesure de la température, (h) gradient (d'après Benhamed, 2012)



**Figure 9.** (A) Représentation du basculement de l'échantillon à  $54,7^\circ$  par rapport au champ magnétique principal. (B) Tête de mesure de la sonde RMN HRMAS pour rotor de 4 mm (Photographie de Doty Scientific Inc. Lindon et al, 2008 ; d'après Benhamed, 2012)

## 2.4 Méthodologie de traitement, de conservation et de préparation des échantillons

### *Prélèvement des tissus et méthode de fixation*

Les conditions de prélèvement, de manipulation et de conservation des tissus biologiques sont cruciales dès lors que l'on s'intéresse à une analyse de métabolites dont la labilité a été démontrée comme fortement dépendante de ces conditions. Des études suggèrent que ce point apparaît potentiellement comme une limite méthodologique dans l'analyse de type métabolomique

(Villas-Boas et al., 2007). Il faut toutefois rappeler que ces conditions ont fait l'objet de très nombreuses publications depuis le début des années 70 en particulier dans le domaine du métabolisme cérébral (Passoneau et al., 1980). En effet le cerveau a un niveau métabolique basal parmi les plus élevés du corps humain. Il va de soi que l'analyse métabolomique requiert des procédés de fixation du tissu biologique adaptés. Ainsi le délai entre l'exérèse d'une pièce opératoire et sa fixation apparaît comme crucial. Dès lors qu'un tissu biologique est prélevé d'un organisme vivant, la rupture d'approvisionnement en nutriments et oxygène initie ce que l'on appelle les processus d'ischémie et de métabolisme anaérobie ayant pour conséquence une variation biochimique à la fois quantitative et qualitative du métabolome. Ce délai est évaluable et connu sous le terme de temps d'ischémie. Les équipes hospitalières opérant dans les blocs opératoires sont tout à fait sensibilisées à cette problématique dans la mesure où les pièces opératoires d'exérèse sont le plus souvent destinées à subir une analyse anatomopathologique contribuant au diagnostic de prise en charge des patients opérés. La qualité des pièces opératoires est ainsi cruciale afin d'optimiser les analyses réalisées en aval. Actuellement la méthode universellement privilégiée est la congélation immédiate par immersion dans l'azote liquide.

Sharpless et Brown (1978) ont montré, chez l'animal, que les concentrations en catécholamines étaient variables selon la technique de prélèvement du tissu cérébral (décapitation, prélèvement, microondes pulsés). Ils montrent également que des variations biochimiques post mortem se produisent dès la 10<sup>ème</sup> minute. Citons également le travail de Lust et al. (1973) qui ont également étudié l'effet des différentes techniques de fixation sur le métabolisme cérébral notamment sur les nucléotides cycliques, le lactate et la phosphocreatine (Tableau 1).

**Table 1.** Concentrations of cyclic AMP and metabolites, and phosphorylase  $\alpha$  as a percentage of total phosphorylase, in rat brain following various methods of fixation. The rats were killed, their brains extracted, and analyses were performed as described in the text. Values represent the mean and the standard error of the mean.

Method*	Cyclic AMP ( $\mu$ mole/kg)†	Phosphocreatine (mmole/kg)†	ATP (mmole/kg)†	Lactate (mmole/kg)†	Phosphorylase $\alpha$ (%)
Freeze-blown (9)	1.17 $\pm$ 0.13	4.00 $\pm$ 0.10	2.41 $\pm$ 0.08	1.23 $\pm$ 0.07	20.1 $\pm$ 0.69
Microwave irradiation (9)	0.73 $\pm$ 0.05‡	1.72 $\pm$ 0.08‡	1.68 $\pm$ 0.03‡	1.71 $\pm$ 0.15‡	
Immersion into liquid N <sub>2</sub> (6)	1.63 $\pm$ 0.16‡	3.40 $\pm$ 0.22	2.30 $\pm$ 0.07	1.90 $\pm$ 0.11‡	53.9 $\pm$ 4.8‡
Decapitation into liquid N <sub>2</sub> (5)	2.62 $\pm$ 0.17‡	1.41 $\pm$ 0.03‡	1.79 $\pm$ 0.06‡	3.16 $\pm$ 0.13‡	62.3 $\pm$ 8.3‡

\* Number of rats per group is given in parentheses. † Wet weight. ‡ Difference from freeze-blown values is statistically significant with  $P < .005$ .

**Tableau 1.** Concentration cérébral de certains métabolites en fonction de la technique de prélèvement (d'après Lust et al., 1973)

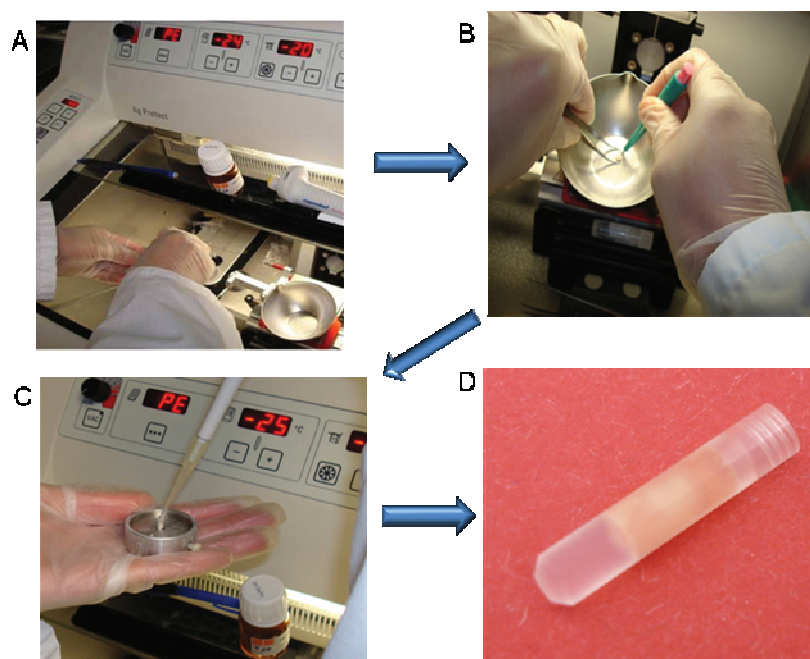
De nombreuses techniques de fixation ont été mises au point depuis les années 60, les plus utilisées sont : (i) la congélation par soufflage (« freeze-blowing » ; Veech, 1980) ; (ii) la congélation par la technique de l'entonnoir (« funnel-freezing » ; Ratcheson, 1980) ; (iii) la décapitation (Quistorff, 1980) ; (iv) l'immersion immédiate après prélèvement couplée ou non à une perfusion

préalable (« snap freezing ») (v) l'irradiation par microondes pulsés (Medina et al., 1980). Il existe d'autres méthodes qui sont toutefois moins utilisées : congélation *in situ* ou « *in situ freezing* », hachage ultrarapide (« *brain chopping* ») etc... Ces techniques sont parfois différemment mises en œuvre selon les équipes. A titre d'exemple pour l'immersion instantanée, différents fixateurs sont utilisés : isopentane refroidi, azote liquide, acide acétique glacial. Chaque technique peut avoir ses avantages selon le type d'analyse à effectuer sur le tissu cérébral. Certaines techniques nécessitent une anesthésie préalable de l'animal, ou la perfusion d'un fixateur au préalable. Ainsi ces techniques seront d'avantage utilisées pour l'étude histologique de marqueurs cérébraux (immunohistochimie par exemple). Dans le domaine du métabolisme cérébral, les méthodes les plus utilisées sont l'irradiation par microondes pulsées et la congélation instantanée par immersion dans l'azote liquide après décapitation. Ces deux techniques n'ont recours à aucun agent pharmacologique (anesthésiques notamment). L'usage des microondes pulsées présente quatre avantages importants : (i) Il permet le sacrifice instantané de l'animal sans agent pharmacologique ; (ii) la fixation du tissu est réalisée *in vivo* s'affranchissant ainsi de tout délai d'ischémie ; (iii) l'inactivation est irréversible même à température ambiante du fait de la dénaturation des protéine sous l'effet de la chaleur induite par les microondes de forte énergie (entre 80 et 100 °C pendant 2 secondes) ; (iv) des études semblent indiquer que les structures cytologiques des cellules sont peu altérées (Login and Dvorak, 1994). Un inconvénient cependant est le coût du dispositif entre 35 000 et 70 000 €. L'immersion instantanée dans l'azote liquide après décapitation est la méthode la plus utilisée car la plus facile et la moins chère à mettre en œuvre pour des résultats satisfaisants. Deux notions sont importantes à garder à l'esprit lorsque l'on fait appel à cette technique : la congélation n'est pas instantanée, celle-ci est plus ou moins rapide en fonction de la taille de l'échantillon. En effet un délai est nécessaire pour que la congélation se fasse jusqu'au cœur de l'échantillon. Il a été montré que la concentration en métabolites peut ainsi varier en fonction du gradient de congélation (de l'extérieur vers l'intérieur ; Quistorff, 1980). Aussi est-t-il préférable d'utiliser des échantillons biologiques de petite taille afin de diminuer cet effet de gradient. Enfin, la congélation n'étant pas irréversible tout traitement ultérieur de l'échantillon devra être effectué à basse température (dans notre cas la préparation de l'insert, cf paragraphe suivant). Ainsi la technique par microondes pulsées apparaît comme la méthode de référence depuis la fin des années 70 pour l'étude du métabolisme cérébral. Cette technique est essentiellement employée par des équipes de référence dans ce domaine de recherche (Violante et al., 2009 ; De Graaf et al., 2009 ; Risa et al., 2009 ; Melo et al. 2005). Néanmoins il faut noter qu'un article récent de Srivastava et al., (2012) suggère que la technique de microondes pulsées modifie la concentration en ATP et en magnésium libre (comparativement à la technique de *freeze-blowing*).

Pour revenir aux prélèvements réalisés au bloc opératoire en vue d'une analyse métabolomique par RMN HRMAS, l'expérience acquise depuis de nombreuses années par notre équipe a permis une optimisation de l'ensemble des paramètres (sensibilisation du chirurgien notamment sur la taille des pièces opératoires et diminution maximale du délai d'ischémie). Toutefois il semble utile de confronter cette méthodologie de fixation à celle des microondes pulsées d'un point de vue des variations biochimiques du métabolome. Ainsi nous avons ainsi simulé chez l'animal les conditions de recueil ayant cours au bloc opératoires, condition que nous avons comparées à la méthode de référence que sont les microondes pulsées. Comme nous le verrons dans ce travail, l'impact des microondes est particulièrement adapté aux analyses HRMAS dans la mesure où le chauffage semble conférer à l'échantillon des propriétés mécaniques particulièrement adaptées à cette technique qui nécessite une rotation à haute vitesse de l'échantillon. Notre travail suggère en effet que les microondes non seulement assurent une qualité de fixation au plus proche des conditions physiologiques mais permet également de limiter drastiquement les variations biochimiques *in situ* au cours des acquisitions RMN. Ce point reste toutefois encore débattu dans la littérature.

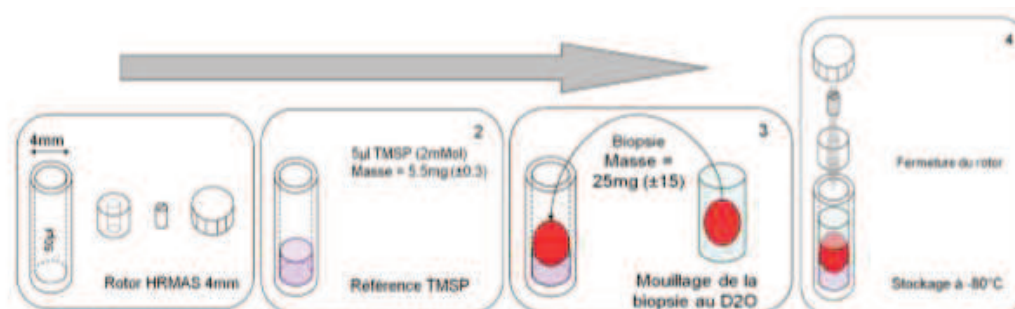
### ***Préparation de l'échantillon***

Un des avantages importants de la technique RMN HRMAS dans les analyses métabolomiques réside notamment dans la simplicité de préparation des échantillons. Ce point est détaillé dans l'article de revue joint au manuscrit (Annexe 2 ; Piotto et al., 2012). La figure 10 ci-dessous issue de cette revue reprend les étapes principales.



**Figure 10.** Préparation d'un échantillon biologique pour analyse RMN HRMAS. (A) L'échantillon est récupéré du congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  et placé dans un cryostat ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). (B) La biopsie est dissequée ou "punchée" afin d'être introduite dans un insert. (D) Insert final. D'après Piotto et al. (2012).

A la suite du travail de dissection permettant d'isoler la structure d'intérêt, 15 à 20 mg de l'échantillon sont placés dans un insert auquel il est adjoint une quantité fixe et connue de  $\text{D}_2\text{O}$  permettant d'obtenir un signal de référence pendant l'acquisition. L'insert est pesé avant et après remplissage de façon à connaître la quantité exacte de tissu biologique introduite. Selon le type d'acquisition, il peut être ajouté un étalon interne destiné à indiquer un déplacement chimique de référence et permettre une quantification (typiquement le TMSP ou Triméthylsilylpropionate dont le déplacement chimique correspond à 0 ppm mais d'autres étalons sont possibles). L'insert est ensuite placé dans un rotor en zirconium surmonté d'un bouchon à ailettes permettant d'en assurer la rotation par flux d'air continu (figure 11).



**Figure 11.** Schéma de préparation d'un insert (d'après Erb, 2008).



## 2.5 Traitement des données et statistiques appliquées aux acquisitions RMN HRMAS

### **Séquence de traitement des données**

**Prétraitement.** La phase de prétraitement inclut un ajustement de phase du spectre, une correction ou une simple optimisation de la ligne de base, un calibrage en fréquence.

**Normalisation.** Cette opération permet de rendre l'ensemble des données homogènes. Il existe de nombreuses méthodes de normalisation : normalisation individuelle par rapport à l'intensité totale du spectre, transformation logarithmique, normalisation par la variance, normalisation de type Pareto.

**Segmentation** (ou « *bucketing* » ou « *binning* »). Les régions d'intérêt sont définies au sein du spectre en fonction des objectifs de l'étude. Dans notre cas nous avons retenu les régions spectrales de 0,5 ppm à 4,7 ppm écartant ainsi le signal de l'eau pour les analyses statistiques. Cette étape consiste ainsi à échantillonner les spectres en  $n$  régions représentant autant de variables dans l'analyse statistique multivariée qui sera réalisée. Les spectres RMN correspondent à un ensemble de plusieurs milliers de points représentés sous la forme d'un spectre. Il s'agit ainsi de réduire la dimensionnalité des signaux par « discrétisation » du spectre. Classiquement dans la littérature la segmentation est opérée pour des valeurs comprises entre 0,01 et 0,04 ppm. Nous avons également appliqué une technique de segmentation par métabolites. Ainsi seuls les signaux de certains métabolites sont retenus sur l'intégralité des spectres acquis pour l'analyse statistique. Il existe une multitude de protocoles de segmentation qualifiés dans la littérature « *d'intelligent binning* ». Il résulte de cette étape une matrice  $N \times M$ ,  $N$  étant le nombre d'échantillons et  $M$  le nombre de variables par échantillon. Nos méthodes suivent les recommandations de la part d'un groupe de travail dirigé par le Pr. Goodacre de l'université de Manchester au sein de la *Metabolomics Society*.

### **Statistiques appliquées aux données RMN HRMAS**

Les analyses statistiques appliquées en métabolomique s'inspirent de celles appliquées aux systèmes biologiques complexes. La nature des informations fournies a pour caractéristique un très grand nombre de variables par rapport au nombre d'observations. Deux méthodes sont principalement utilisées selon qu'elles soient supervisées ou non, c'est-à-dire avec une hypothèse a priori. D'une part l'analyse en composantes principales (ACP) aussi connue sous le nom d'analyse par décomposition en valeur singulière. Le but de cette méthode est de déterminer une suite d'axes orthogonaux conservant au mieux les distances entre individus. Ces axes sont appelés composantes

principales et définissent un nouveau système de coordonnées. Il s'agit ainsi d'une transformation orthogonale linéaire. D'autre part la régression linéaire aux moindres carrés partiels (PLS) associant ou non une hypothèse discriminante (PLS-DA). Ce type d'analyse est particulièrement bien adapté aux données issues de la métabolomique (Wold et al., 1983 ; 1991). Cette méthode permet d'intégrer aux données matricielles l'appartenance à une classe. Elle est ainsi particulièrement utile lorsque la colinéarité de certaines variables est élevée. A la place de décomposer d'abord la matrice spectrale X en un ensemble de vecteur propres et de les régresser vers Y dans une étape séparée, la PLS utilise l'information de Y pendant la décomposition. Ceci implique que les variables expliquant le mieux les Y seront plus fortement pondérées. Les données Y peuvent être introduites dans les données matricielles ou extrapolées. Là encore la *Metabolomics Society* a fait part de ses recommandations. La méthode PLS-DA est la méthode supervisée la plus utilisée en métabolomique, elle apparaît rapide et efficace. Cette méthode a été spécifiquement développée pour l'étude des relations entre un ensemble de données Y (dans notre cas, le statut histologique de l'hippocampe par exemple) et un ensemble de variables explicatives X (les valeurs issues des spectres 1D  $^1\text{H}$  RMN HRMAS) lorsque la colinéarité est forte ce qui est le cas lorsqu'on les compare des structures cérébrales. Alors que l'analyse par ACP décompose les valeurs X issues de la matrice, l'analyse PLS tient compte dans la décomposition des valeurs X et des valeurs Y (le plus souvent qualitative) ainsi l'analyse PLS utilise l'information provenant de Y pour la décomposition en accordant un certains poids aux observations en fonction de leur statut. L'évaluation de la qualité de l'ajustement des données est effectuée à l'aide de trois indices. L'indice  $R^2Y$  indique la part de la variance expliquée par le modèle issue des variables Y, l'indice  $R^2X$  fait de même pour les variables X. L'indice  $Q^2$  est une mesure globale de la qualité de l'ajustement du modèle et de sa qualité prédictive. La qualité de l'ajustement est jugé satisfaisante lorsque la valeur  $Q^2$  est comprise entre 0,5 et 1. Cet indice est dépendant du nombre de composantes prises en compte pour décrire les données. Un indice  $Q^2$  cumulatif ( $Q^2$  cum) peut ainsi être défini. Une progression de cet indice vers 1 avec l'ajout de composantes pour la description du modèle suggère la présence de covariables non prises en compte dans le modèle. Par ailleurs une validation de modèle peut être effectuée par permutation des échantillons en fonction de leur appartenance (ou variable Y le plus souvent). Enfin l'identification des métabolites discriminants est basée sur la notion de VIP pour *Variable Importance in the Projection*. Chaque variable est ainsi associée à une valeur VIP reflétant son niveau de contribution à distinguer les deux groupes. Cette valeur reflète ainsi l'importance de la variable dans le modèle à savoir sa corrélation avec toutes les autres réponses, et notamment les projections de la variable X ainsi que sa capacité à distinguer les groupes (donc à expliquer les variances de la variable Y). Les valeurs supérieures à 1 sont celles qui contribuent le plus à expliquer le modèle. Ainsi la réalisation d'un modèle PLS-DA permet d'établir une liste de valeurs VIP associées à chaque variable donc à

chaque métabolite. Sont considérés comme discriminants les métabolites ayant les valeurs VIP les plus élevées. Nous avons retenu la valeur 1,3 comme seuil acceptable d'identification des métabolites discriminants. Cette pratique est couramment admise dans la littérature toutefois le seuil est habituellement moins élevé (souvent entre 0,8 et 1,2). Pour la suite dans la description de nos résultats nous parlerons de métabolites discriminants en faveur de tel ou tel groupe. Cette notion de métabolite discriminant ou associé à un groupe peut avoir pour interprétation biologique une augmentation de concentration en valeur absolue dans un groupe et/ou une contribution significative à expliquer la variance des données d'un groupe. Il s'agit d'une analyse multivariée donc cette contribution est toujours évaluée en regard de l'ensemble des données du modèle. Ainsi cette approche est complémentaire des analyses statistiques de type test t (test des moyennes) dans lesquels les métabolites sont comparés deux à deux de manière isolée. L'image la plus parlante serait de dire que l'approche PLS-DA en HRMAS permet de comparer un ensemble large de signaux associés aux métabolites plutôt que de comparer deux à deux des concentrations en métabolites.

### 3. INTRODUCTION SUR L'ÉPILEPSIE

#### 3.1 Définition

Le terme épilepsie provient du verbe grec *epilambanien* qui signifie prendre par surprise. Ce terme illustre bien le caractère imprévisible et incontrôlable de la survenue d'une crise d'épilepsie. La crise d'épilepsie échappe à tous les contrôles physiologiques, elle survient lorsque l'équilibre électrochimique cérébral entre les mécanismes excitateurs et inhibiteurs est rompu. Cette crise est alors l'expression clinique d'un dysfonctionnement transitoire de l'activité électrique dû à l'hyperactivation d'un réseau plus ou moins étendu de neurones qui déchargent de façon synchrone et paroxystique. Ce dysfonctionnement peut être aigu et résulter d'un phénomène réactionnel faisant intervenir un facteur déclenchant de type traumatisme crânien, troubles infectieux, sevrage, excès alcoolique... On parle dans ce cas de crises occasionnelles. Ce dysfonctionnement peut néanmoins être permanent et activé par intermittence, on parle dans ce cas d'épilepsie. Ainsi l'épilepsie est un trouble neurologique chronique qui se définit par la récurrence spontanée de crises, c'est-à-dire sans facteur déclenchant mais dû à des circuits neuronaux altérés de façon permanente. La survenue d'une crise correspond à ce que l'on appelle la période critique. Entre les crises c'est-à-dire en période intercritique, l'organisation anatomo-fonctionnelle du circuit épileptique reste anormale mais ne s'exprime pas cliniquement. L'évolution de la maladie est variable selon le type de crises, celles-ci peuvent se répéter plus ou moins fréquemment et plus ou moins longtemps au cours de la vie. Ainsi une crise est un événement bien défini dans le temps (avec un début et une fin) alors que l'épilepsie est une maladie chronique. L'épilepsie regroupe en fait des pathologies différentes du fait de leur origine, de leurs manifestations et de leur pronostic. Cependant au cours de la dernière décennie cette vision « classique » de la maladie épileptique à évoluer essentiellement sous l'impulsion de la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE, International League Against Epilepsy). La définition de la pathologie épileptique a évolué (Fisher et al., 2005). La distinction entre crise et maladie épileptique reste effective toutefois cette dernière est plus souvent associée à une altération cérébrale permanente identifiée ou fortement suspectée (morphologique, histologique, génétique, métabolique...). Ainsi une crise épileptique isolée chez une personne ne présentant aucune anomalie cérébrale associée ne permettra pas d'établir un diagnostic d'épilepsie. En revanche, une crise unique chez un individu présentant une susceptibilité cérébrale permettant de rendre compte de cette crise permet d'aboutir à la définition d'une épilepsie. De plus, la définition actuelle intègre les perturbations d'ordre neurobiologiques,

cognitives, sociales et psychosociales. Ainsi la maladie épileptique ne repose plus seulement sur l'apparition récurrente de crises épileptiques. Le tableau ci-dessous reprend les éléments de définitions tels que proposés par l'ILAE.

Crise épileptique	Epilepsie
Mode d'initiation et d'arrêt	Apparition d'au moins une crise
Manifestation cliniques	Altération suggérant une augmentation de sensibilité à l'apparition de crises
Synchronisation cérébrale anormale	Anomalies associées d'ordre neurobiologiques, cognitives, psychosociales et/ou sociales

**Tableau 2.** Eléments de définitions de la crise épileptique et de la maladie épileptique proposés par l'ILAE (d'après Fisher et al., 2005).

### 3.2 Classification des crises et syndromes épileptiques

Cette classification est en évolution régulière par l'ILAE en fonction des connaissances acquises au travers de la littérature et de l'évolution des pratiques cliniques. Ci-dessous une brève description des évolutions majeures depuis 1981.

La diversité des formes cliniques de la maladie a conduit à établir une classification basée sur deux critères : la sémiologie clinique des événements critiques et les anomalies observées sur l'électroencéphalogramme (EEG) (ILAE, 1981). Cette classification établit une dichotomie entre « crises partielles » et « crises généralisées » en y associant les manifestations cliniques et les caractéristiques EEG les plus couramment observées. Les « crises généralisées » (environ 40% des cas) font référence aux décharges paroxystiques intéressant simultanément les deux hémisphères cérébraux. Les caractéristiques EEG et les manifestations cliniques sont bilatérales, synchrones et le plus souvent symétriques d'origine corticale ou sous-corticale. Les « crises partielles » ou « focales » (environ 60% des cas) renvoient aux crises durant lesquelles la décharge paroxystique a pour origine un seul hémisphère cérébral. Parmi ces crises partielles on distingue :

- Les crises simples sans altération de la conscience

- Les crises complexes au cours desquelles il y a d'emblée ou secondairement une altération de la conscience
- Les crises secondairement généralisées dans lesquelles on observe une propagation des décharges paroxystiques à l'autre hémisphère. Dans ce cas les anomalies EEG sont bilatérales mais restent cependant asymétriques et asynchrones.

Enfin une troisième dénomination regroupe les crises que l'on ne peut classer.

En 1989, l'ILAE adopta une nouvelle classification qui conserve les deux critères précédemment décrits en y intégrant 2 autres notions à savoir l'étiologie des crises et des données physiopathologiques à caractère essentiellement topographique (tableau 3). Ceci a permis de définir un certain nombre de syndromes au sein de cette classification. Un syndrome épileptique est défini par « la conjonction de symptômes et de signes apparaissant simultanément d'une manière constante et non fortuite ». Les paramètres qui caractérisent un syndrome épileptique sont : (1) la topographie de la zone épileptogène, (2) les caractéristiques des crises c'est à dire leur sémiologie, leur fréquence, ainsi que les facteurs favorisant ou déclenchant leur survenue, (3) l'état intercritique (présence ou absence de déficits neurologiques, cognitifs ou d'anomalies permanentes ou intermittentes du rythme de fond EEG), (4) les éventuelles lésions structurales, (5) l'histoire naturelle (antécédents familiaux et personnels, âge de début, profil évolutif, réactivité pharmacologique).

Enfin une dernière mise à jour récente de l'ILAE a été publiée en 2010 (Berg et al., 2010). Celle-ci reprecise la notion de classification en intégrant davantage de critères neurobiologiques, cliniques, et pronostiques adaptés non seulement à la pratique clinique mais également à la recherche tout en s'attachant à diminuer le nombre de syndromes. A titre d'exemple la commission admet que la dichotomie entre crise « focale » et « généralisée » peut apparaître comme un critère secondaire toutefois cette terminologie a été conservée car elle reflète de façon assez fidèle l'apparition de crise généralisée imputable empiriquement à une lésion focale. Ainsi la dichotomie entre crises partielles complexes et crises partielles simples pour les épilepsies focales a été abandonnée. L'objectif est d'encourager une meilleure caractérisation de la pathologie sous jacente vis-à-vis des manifestations observées. Les autres modifications à noter sont : les crises néonatales ne sont plus un syndrome à part, la classification des épilepsies absences a été simplifiée, la notion de spasmes épileptiques a été intégrée. La commission suggère également de remplacer les termes idiopathique, symptomatique et cryptogénique par respectivement génétique, morfo-métabolique et d'origine inconnue. L'impact de cette nouvelle classification sur les pratiques cliniques reste toutefois à étudier même si certains travaux récents ont été publiés (Uttam et al., 2013 ; van Campen et al., 2013).

### 3.3 Epidémiologie

Près de 5% de la population mondiale est susceptible d'avoir au moins une crise une fois dans leur vie mais seules 30 à 65 % de ces crises récidiveront et répondront ainsi à la définition de l'épilepsie. La prévalence moyenne de l'épilepsie, soit la proportion de la population atteinte d'épilepsie à un moment donné dans le temps, est estimée d'après de nombreuses études effectuées dans le monde à environ 4‰ à 8 ‰ (Hauser et al., 1990). Soixante-dix à 80 % de ces patients connaissent des périodes d'au moins cinq ans de contrôle des crises le plus souvent par un traitement médicamenteux (Annegers et al., 1979). Vingt à 30% des patients développeront une épilepsie pharmcorésistante (Kwan and Brodie, 2000). Toutes épilepsies confondues, il y a donc dans le monde à un moment donné entre 40 et 50 millions d'épileptiques. En France environ 450 000 personnes sont répertoriées dont 250 000 jeunes de moins de 20 ans. 50% des épilepsies se manifestent avant l'âge de 10 ans. L'incidence annuelle de l'épilepsie, soit le nombre de nouveaux cas survenant pendant une année, est d'environ 50 pour 100 000. Cependant cette incidence varie beaucoup selon l'âge des personnes considérées. Elle est plus importante chez les enfants de moins de 1 an et chez les personnes âgées et moindre chez les adultes de 30 à 50 ans. Dans les pays en voie de développement des études suggèrent que l'incidence annuelle de l'épilepsie serait proche de 100 pour 100 000, soit environ le double de l'estimation retrouvée dans les pays industrialisés. Les principales raisons de cette forte incidence semblent être liées aux risques plus élevés d'infections cérébrales dues aux plus nombreux cas de méningite, de paludisme, aux complications obstétricales pré et postnatales et à la malnutrition.

En termes de mortalité, l'espérance de vie des épileptiques est globalement inférieure de 10 à 20 % à celle des sujets non épileptiques. Il existe en effet une surmortalité dans la population des épileptiques. Il a notamment été montré que le taux de mortalité par épilepsie chez les adultes jeunes est trois fois plus élevé que le taux de mortalité toutes causes confondues au même âge. Cependant, les circonstances de mort d'une personne épileptique ne sont pas toujours en relation directe avec les crises : maladie cérébrale sous-jacente comme une tumeur ou une infection, crise survenant dans des circonstances dangereuses (noyade, brûlure...), état de mal épileptique, conséquence directe de la crise (suffocation, trouble de la déglutition, traumatisme crânien, fracture cervicale...), conséquences soudaines et inexplicables de la crise (arrêt respiratoire, dysfonctionnement du rythme cardiaque, suicide...).

**Tableau 3:** Seconde classification des maladies épileptiques d'après la ligue internationale contre l'épilepsie (Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1989).

<p><b>1. Epilepsies et syndromes épileptiques focaux ou partiels</b>          Idiopathiques, liés à l'âge :  <i>Epilepsie bénigne de l'enfance à paroxysmes rolandiques</i>  <i>Epilepsie bénigne de l'enfance à paroxysmes occipitaux</i>  <i>Epilepsie primaire de lecture</i>          Symptomatiques  <i>Syndrome de Koyewnikow ou épilepsie partielle continue</i>  <i>Epilepsies lobaires</i>              Epilepsie du lobe temporal, Epilepsie du lobe frontal              Epilepsie du lobe pariétal, Epilepsie du lobe occipital          Cryptogéniques : dont l'étiologie est inconnue</p> <p><b>2. Epilepsies et syndromes épileptiques généralisés</b>          Idiopathiques, liés à l'âge, avec par ordre chronologique :  <i>Convulsions néonatales familiales bénignes</i>  <i>Convulsions néonatales bénignes</i>  <i>Epilepsie myoclonique bénigne de l'enfance</i>  <i>Epilepsie absence de l'enfance</i>  <i>Epilepsie absence de l'adolescent</i>  <i>Epilepsie myoclonique juvénile</i>  <i>Epilepsie à crises Grand Mal du réveil</i>  <i>Epilepsie à crises précipitées par certaines modalités spécifiques</i>  <i>Autres épilepsies pouvant être classées comme généralisées idiopathiques sans faire partie de ces syndromes</i>          Cryptogéniques ou symptomatiques, avec en particulier :  <i>Spasmes infantiles (syndrome de West)</i>  <i>Epilepsie avec crises myoclonico-astatiques</i>  <i>Epilepsies avec absences myocloniques</i>          Symptomatiques          Sans étiologie spécifique              <i>Encéphalopathie myoclonique précoce</i>              <i>Encéphalopathie infantile précoce avec suppression-burst (syndrome d'Ohtahara)</i>              Autres          Syndromes spécifiques              <i>De nombreuses étiologies métaboliques ou dégénératives peuvent entrer dans ce cadre</i></p> <p><b>3. Epilepsie dont le caractère focal ou généralisé n'est pas déterminé</b>          Avec association de crises généralisées et partielles, avec en particulier :  <i>Crises néonatales</i>  <i>Epilepsie myoclonique sévère</i>  <i>Epilepsie avec pointes-ondes continues pendant le sommeil lent</i>  <i>Epilepsie avec aphasie acquise (syndrome de Landau-Kleffner)</i>          Sans caractères généralisés ou focaux certains</p> <p><b>4. Syndromes spéciaux</b>          4.1 Crises occasionnelles, liées à une situation épileptogène transitoire              <i>Convulsions fébriles</i>              <i>Crises uniquement précipitées par un facteur toxique ou métabolique</i>          4.2 Crise isolée, état de mal isolé</p>
---



## 4. EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL

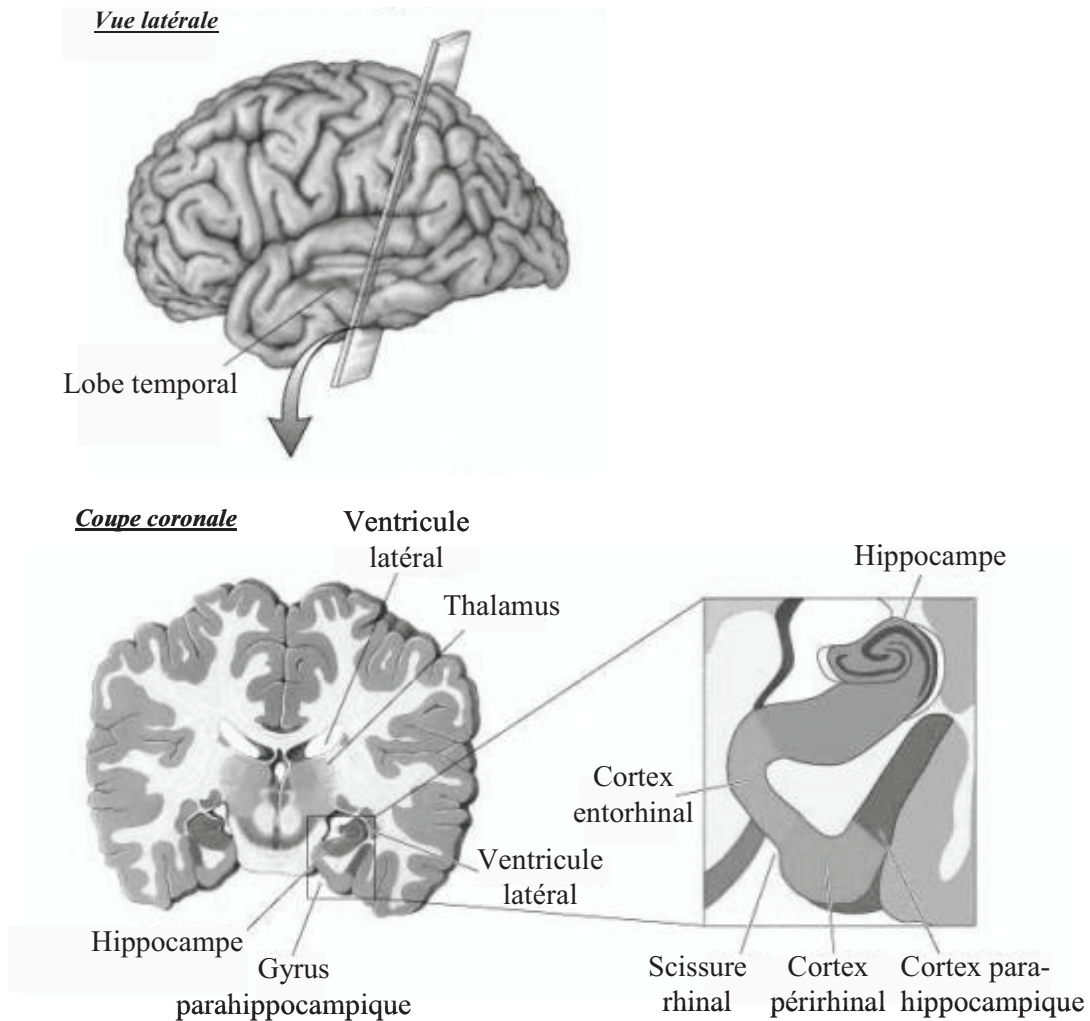
### 4.1 Organisation du lobe temporal

Le lobe temporal se situe en dessous des lobes frontal et pariétal et en avant du lobe occipital. Au sein du lobe temporal, on retrouve les principales structures cérébrales du système limbique (Braak et al., 1996) :

- La formation hippocampique
- Les cortex associatifs limbiques incluant le gyrus parahippocampique (visuel, auditif)
- Le complexe amygdalien

L'amygdale et l'hippocampe sont situés dans la région médiane du lobe temporal et sont adjacents au gyrus parahippocampique. Ce dernier est une « continuité » du gyrus cingulaire au sein de la surface inférieure du cerveau. Les cortex du gyrus parahippocampique incluent le subiculum et le cortex entorhinal qui sont deux structures fonctionnellement liées à l'hippocampe (figure 12).

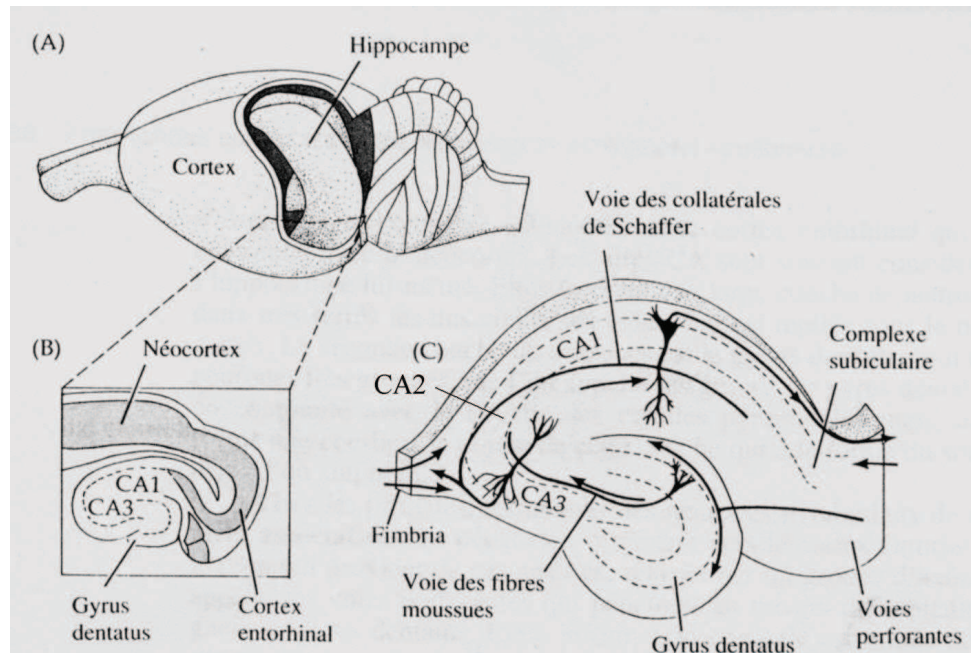
Le lobe temporal comprend la région cérébrale impliquée dans le traitement du son : le cortex auditif primaire. Les cortex temporaux sont les premières cibles des informations sensorielles auditives et vestibulaires. Le cortex temporal gauche comprend l'aire de Wernicke, qui est essentielle à la compréhension du langage. Des dommages ou des dysfonctionnements cellulaires dans ces régions du lobe temporal peuvent par conséquent entraîner des altérations sensorielles et cognitives importantes. Des dommages au niveau des aires associatives du lobe temporal gauche altèrent fréquemment la compréhension du langage, tandis que des dommages au niveau de l'hémisphère droit altèrent plutôt la distinction de la qualité tonale des sons. De plus, certaines régions du cortex temporal sont également impliquées dans des mécanismes de traitement visuel. Des dommages au niveau de ces régions peuvent entraîner une altération de la perception des visages, et dans certains cas de tumeurs, des hallucinations visuelles. Les régions limbiques du lobe temporal, l'hippocampe et l'amygdale, jouent un rôle dans les phénomènes de motivation, d'émotion et de mémoire. En effet, l'amygdale est liée à de nombreuses voies corticales et sous-corticales impliquées dans les fonctions allant des comportements sexuels, d'agression et de défense au plus haut niveau des fonctions



**Figure 12.** Topographie de l'hippocampe et des cortex limbiques associés chez l'homme  
<http://www.physiology.wisc.edu/neuro524/learning102/slide12.jpg>

cognitives (Alheid, 2003 ; Rasia-Filho, 2000). Des études animales ont montré que l'amygdale est cruciale dans la régulation physiologique des émotions (Meunier et al., 1999). L'amygdale est également impliquée de façon critique dans l'apprentissage et le stockage des informations faisant intervenir l'imprégnation émotionnelle d'un événement (LeDoux, 1993). Les fonctions de l'hippocampe sont multiples et il semble jouer un rôle important dans la plupart des phénomènes mnésiques. Ainsi des dommages localisés au niveau de l'ensemble des structures limbiques temporales peuvent entraîner diverses répercussions cognitives et comportementales, telles que des troubles de l'humeur, des troubles anxieux, des dysfonctionnements mnésiques (Phelps, 2004 ; Squire et al., 2004 ; Eichenbaum et al., 1996). Les conséquences d'un dysfonctionnement du lobe temporal sont fréquemment rapportées dans les épilepsies du lobe temporal et sont dépendantes de la nature et de la localisation du foyer épileptique.

**Connectivité anatomique et fonctionnelle au sein du cortex temporal.** Celle-ci est très bien décrite chez le rat. La figure 13 détaille l'organisation anatomique des circuits neuronaux au sein du lobe temporal et plus particulièrement au sein de l'hippocampe encore appelé corne d'Ammon. La corne d'Ammon est divisée en trois régions, CA1, CA2 et CA3, selon la morphologie des cellules pyramidales qui les composent. Cette organisation se caractérise notamment par un circuit trisynaptique dont le premier maillon est la voie perforante qui se projette depuis le cortex entorhinal vers le gyrus denté ou *gyrus dentatus*. Le second maillon se projette depuis les cellules granulaires du gyrus denté vers les cellules pyramidales de la région CA3, cette projection est assurée par la voie des fibres moussues (axones des cellules granulaires). Le troisième lie les cellules pyramidales de CA3 aux neurones de la région CA1 par la voie des collatérales de Schaffer (axones des cellules pyramidales de CA3). Enfin des projections depuis CA1 et le subiculum « distribuent » l'information traitée par l'hippocampe à différentes structures corticales et sous-corticales essentiellement par deux voies principales : celle du fornix qui se projette au niveau du striatum ventral, du septum lateral, des régions hypothalamiques et enfin du cortex préfrontal et la voie de sortie non-fornicale essentiellement connectée aux régions parahippocampiques, en particulier le cortex entorhinal (Witter et al., 2000) qui possède des connexions bidirectionnelles avec les cortex perirhinal, postrhinal et parahippocampique (Burwell et Amaral, 1998; Suzuki et Amaral, 1994).



**Figure 13 .** Schéma des connexions anatomiques au sein de l'hippocampe chez le rat. ([http://www.lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a\\_07/a\\_07\\_cl/a\\_07\\_cl\\_tra/a\\_07\\_cl\\_tra.htm](http://www.lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_07/a_07_cl/a_07_cl_tra/a_07_cl_tra.htm))

## 4.2 Caractéristiques générales

L'ELT met en jeu une épileptogenèse progressivement acquise, provoquée par des changements secondaires associés à une agression initiale. Chez 90% des patients présentant une ELT, une agression aiguë est survenue dans l'enfance, la plupart du temps avant 5 ans. L'ELT est une maladie évolutive puisqu'il existe une période latente sans crise d'une durée moyenne de 5,9 années entre l'agression initiale et les premières crises (French et al., 1993). Dans les ELTs, l'hippocampe et les structures anatomiquement reliées semblent lésés et subissent des réorganisations.

L'hypothèse de la survenue d'une agression aiguë dans l'enfance à l'origine des lésions au niveau de l'hippocampe puis d'une épilepsie subséquente a été initialement proposée par Margerison et Corsellis (1966). Une étude rétrospective prenant en compte les agressions initiales ayant abouti à une épilepsie secondaire a tenté de corréler les caractéristiques de l'agression initiale, l'âge de survenue, les dommages neuronaux induits et l'épilepsie (Mathern et al., 1996). Il semble que lorsque l'agression initiale est accompagnée ou caractérisée par des crises (convulsions fébriles, état de mal), le temps de latence avant l'apparition de l'épilepsie soit plus court que lorsque l'agression initiale n'est pas accompagnée de crises comme lors d'une hypoxie, d'un traumatisme crânien ou d'une méningite. La durée de l'agression initiale (au moins 30 min de perte de conscience ou au moins quatre heures d'altérations cognitives) serait en relation avec la prévalence de l'épilepsie et avec le temps de latence avant l'apparition des premières crises (Lewis, 1999 ; Mathern et al., 1995a).

## 4.3 Caractéristiques neuropathologiques

### 4.3.1 L'hippocampe

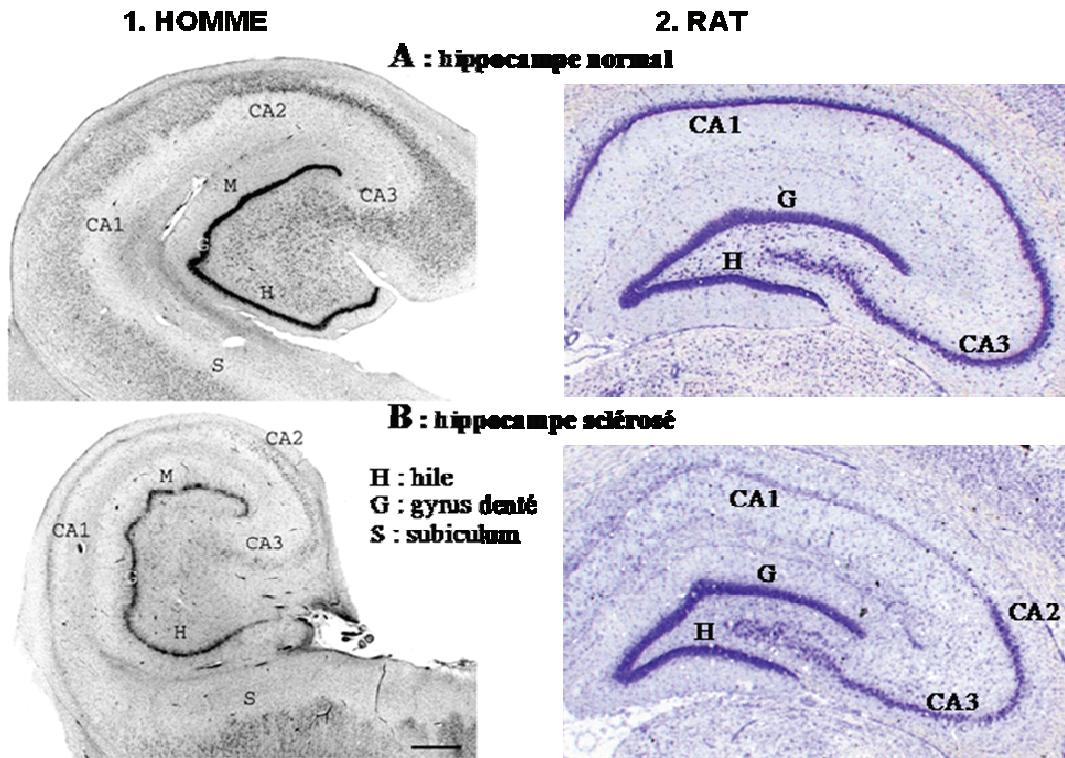
Les épilepsies de la face mésiale du lobe temporal ou EMLTs représentent 50 à 70% des ELTs et se caractérisent par la présence d'une sclérose mésiale temporale (la partie mésiale correspondant à la partie interne du lobe temporal) (de Lanerolle et al., 1992 ; 2003 ). On évoque la sclérose de l'hippocampe lorsque la lésion touche exclusivement l'hippocampe et la sclérose mésiale temporale lorsque la lésion touche toutes les structures de la face interne, c'est-à-dire non seulement l'hippocampe, mais aussi l'amygdale et/ou les gyri adjacents. Les régions CA1 et le hile sont les deux régions hippocampiques les plus vulnérables dans la sclérose de l'hippocampe. Le diagnostic de sclérose de l'hippocampe est établi lorsqu'une perte de plus de 50% de neurones est observée au

niveau de la couche pyramidale et du hile (Mathern et al., 1997 ; Bruton, 1988 ; Wieser, 2004). Dans la plupart des cas la sclérose correspond à une perte de volume ou à une atrophie hippocampique visible en IRM. En effet, une corrélation entre le volume hippocampique et la densité cellulaire a pu être établie (Mamlgren et al., 2012 ; Lee et al., 1995 ; Cascino et al., 1991). Cette particularité anatomique a été rapportée chez près de deux tiers des patients souffrant d'ELT pharmacorésistante (Mathern et al., 2002 ; Bernasconi et al., 2006). Mais une analyse neuropathologique réalisée chez 183 patients ayant subi une ablation partielle du lobe temporal antérieur pour cause d'ELT pharmacorésistante semble suggérer que cette proportion serait sous-estimée (Thom et al., 2002). De plus, les cellules du hile du gyrus denté exercent un contrôle sur les activités arrivant à l'hippocampe, ces cellules interviennent au niveau du premier relais synaptique au sein de la boucle trisynaptique. Les pertes cellulaires importantes au niveau du hile altèrent ainsi les mécanismes de contrôle et de modulation des transmissions excitatrices et inhibitrices. Il est probable que ces pertes jouent un rôle majeur dans l'initiation ou la propagation des crises. Dans le même temps les pertes neuronales s'accompagnent d'un bourgeonnement et d'une réorganisation des fibres myélinisées, axones des cellules granulaires du gyrus denté (Houser et al., 1990). Des bourgeonnements dendritiques et axonaux au niveau des interneurons GABAergiques et peptidergiques (Neuropeptide Y et somatostatine) de la couche moléculaire du gyrus denté ont également été rapportés (Loup et al., 2000; Malgoczy et al., 2000). Enfin, une augmentation des marqueurs de neurones immatures a été observée chez les patients souffrant d'EMLT (Crespel et al., 2005). Récemment l'ILAE a proposé une méthode de classification permettant de mieux caractériser le statut histologique de la sclérose de l'hippocampe (Blümcke et al., 2013). Trois types de sclérose ont été définis selon la localisation des pertes neuronales et de la gliose observées au sein des subdivisions de la corne d'Amon (CA1 et CA 4 essentiellement).

Toutefois la question de savoir si la sclérose de l'hippocampe est responsable des crises ou au contraire en est la conséquence du fait de leur répétition reste aujourd'hui encore débattue. Selon plusieurs auteurs, trois observations majeures permettent d'admettre la corrélation entre la sclérose de l'hippocampe et l'épilepsie. Premièrement, les résections sont plus efficaces lorsque l'hippocampe est intégré à la partie réséquée (Wyler et al., 1995). Deuxièmement, l'analyse neuropathologique révèle une sclérose de l'hippocampe dans près de deux tiers des patients (Blumcke et al., 2013) et cette proportion peut atteindre 83% des prélèvements chirurgicaux provenant de patients atteints d'ELT (French et al., 1993). Enfin les enregistrements EEG profonds (SEEG) révèlent les crises à l'endroit même de la sclérose dans 80% des cas (King et al., 1997a). La sclérose contribuerait ainsi à la survenue des crises.

Ce type d'interprétation est à nuancer au regard des données observées chez les très jeunes enfants où une sclérose hippocampique a été identifiée immédiatement après une agression initiale c'est-à-dire bien avant l'apparition de l'épilepsie (Grunewald et al., 2001). Kobayashi et al. (2001) montrent que près de 30 % des personnes issues d'une même famille dont certains membres souffrent d'ELT avaient une imagerie morphologique en IRM compatible avec une sclérose malgré l'absence de pathologie épileptique. Plus récemment Tsai et al. (2013) rapportent des anomalies morphologiques subtiles de l'hippocampe chez des sujets ayant un membre familial atteint d'ELT comparé à des sujets témoins. Une autre façon de considérer ce type de données serait de considérer les crises fébriles comme la conséquence d'une sclérose préexistante. Des scléroses de l'hippocampe ont également été observées chez des patients âgés non-épileptiques atteints de pathologies ischémiques ou neurodégénératives (Zarow et al., 2008 ; Nelson et al., 2011). Enfin des données neuropathologiques récentes obtenues chez l'homme et dans certains modèles animaux semblent réconcilier ces deux interprétations. Des données d'imagerie semblent indiquer que même si l'agression initiale est capable d'induire une sclérose de l'hippocampe, la répétition des crises épileptiques peut également aggraver de manière lente mais certaine l'atrophie au niveau de cette structure ainsi que d'autres structures corticales (Pitkänen et Sutula, 2002 ; Mathern et al., 1995). Ce type d'évolution a déjà été suggéré dans les cas d'ELT de longue durée où il apparaît que des dommages peuvent évoluer et même atteindre l'hippocampe controlatéral (Jokeit et al., 1999 ; Bonilha et al., 2003). L'aggravation de ces dommages semble par ailleurs corrélée à la durée de la maladie, l'âge d'apparition des crises et aux antécédents de convulsions fébriles (von Lehe et al., 2006 ; Theodore et al., 2004 ; Blumcke et al., 1999 ; Mathern et al., 1995). Ces études sont à contraster avec d'autres rapports indiquant un lien partiel entre EMLT et sclérose de l'hippocampe (Brazdil et al., 2009). L'hypothèse actuellement avancée serait que la lésion initiale induirait l'apparition d'activités électriques anormales au sein de l'hippocampe. La répétition de ces activités électriques anormales entraînerait de nouvelles pertes cellulaires et des réorganisations. Les réorganisations synaptiques, dendritiques, de récepteurs et de transporteurs neuronaux et gliaux ainsi que la neurogénèse récemment décrite dans l'hippocampe et plus particulièrement dans l'hippocampe épileptique, sont des facteurs qui pourraient ainsi rendre compte de l'épileptogénèse à partir d'une lésion initiale. Dans l'ensemble il est possible d'envisager la sclérose de l'hippocampe comme un processus dynamique dans la mesure où l'atrophie semble progressive et dépendante à la fois de l'agression initiale et de la durée de la maladie (Mathern et al., 2002). Cette hypothèse physiopathologique reste toutefois à confirmer. Un travail de Thom et al. (2005) a montré sur une étude neurohistologique post-mortem que pour certains patients dont les crises étaient mal contrôlés par les traitements médicamenteux, la dispersion des cellules granulaires du hile était corrélée aux pertes neuronales au sein de l'hippocampe. Ce même auteur a récemment montré,

toujours selon une étude neurohistologique, que la sclérose de l'hippocampe était hétérogène en regard de l'axe longitudinal de l'hippocampe (Thom et al., 2012). La figure 14 présente les anomalies neuroptahologiques au sein de l'hippocampe chez l'homme et l'animal.



**Figure 14.** Comparaison de coupes histologiques de scléroses hippocampiques chez l'homme (à gauche) et le rat (à droite). Les microphotographies obtenues chez l'humain proviennent d'un prélèvement autopsique d'hippocampe non-sclérosé (1A) et d'une résection chirurgicale d'un hippocampe sclérosé d'un patient présentant une épilepsie du lobe temporal (1B) ; Images de F Loup, Institut de Pharmacologie de l'Université de Zürich. Les coupes histologiques d'hippocampe normal (2A) et sclérosé (2B) de rats sont des coupes coronales colorées à la thionine provenant de rats devenus épileptiques à la suite d'une induction d'un état de mal par le lithium et la pilocarpine (nos propres travaux).

#### 4.3.2 Anomalies neuropathologiques extrahippocampiques

Bien que la sclérose de l'hippocampe soit une caractéristique présente dans la majorité des ELTs, des lésions en dehors de l'hippocampe peuvent être observées. Leur rôle dans l'épileptogénèse n'est pas déterminé, mais il semble que la propagation des lésions aux structures extrahippocampiques soit liée à la répétition des crises et à la durée de l'épilepsie. De plus, les lésions dans ces structures

peuvent vraisemblablement induire des réorganisations et mettre en place de nouveaux foyers épileptogènes puisque la résection de l'hippocampe seul ne met pas toujours un terme aux crises.

Les scléroses hippocampiques s'étendent parfois jusqu'au complexe amygdalien (Pitkänen et al., 1998). Le pourcentage de patients présentant des dommages dans l'amygdale augmente avec la sévérité de la sclérose hippocampique (Bruton et al., 1988). Certains travaux montrent que le volume de l'amygdale mesuré chez des patients juste après un état de mal reste inchangé après des années de crises (Cendes et al., 1993) alors que d'autres travaux relient la fréquence des crises à la taille de la lésion amygdalienne (Kälviäinen et al., 1997). Par ailleurs, l'efficacité d'une résection est moins bonne dans les cas de sclérose amygdalienne pure comparativement aux patients atteints de sclérose de l'hippocampe (Miller et al., 1994). Ces différences laissent supposer que les mécanismes et les circuits entrant en jeu dans l'épilepsie liée à une sclérose amygdalienne pure sont différents des mécanismes et des circuits de la sclérose de l'hippocampe. D'un point de vue neuropathologique des anomalies structurelles ont été observées au niveau de plusieurs noyaux amygdaliens (Aliashkevich et al., 2003). Des données électrophysiologiques récentes ont mis en évidence une initiation extrahippocampique des crises, notamment au sein de l'amygdale et du gyrus parahippocampique (Graebenitz et al., 2011 ; Kullmann et al., 2011). Une augmentation de volume de l'amygdale a également été décrite chez des patients atteints d'ELT (Mitsueda-Ono et al., 2011). Cependant aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la durée de l'épilepsie et le volume de l'amygdale (Salmenperä et al., 2001 ; Ho et al., 1998). Certains auteurs évoquent même le terme de sclérose de l'amygdale (Wieser, 2004) qui n'est toutefois pas reconnu dans la littérature.

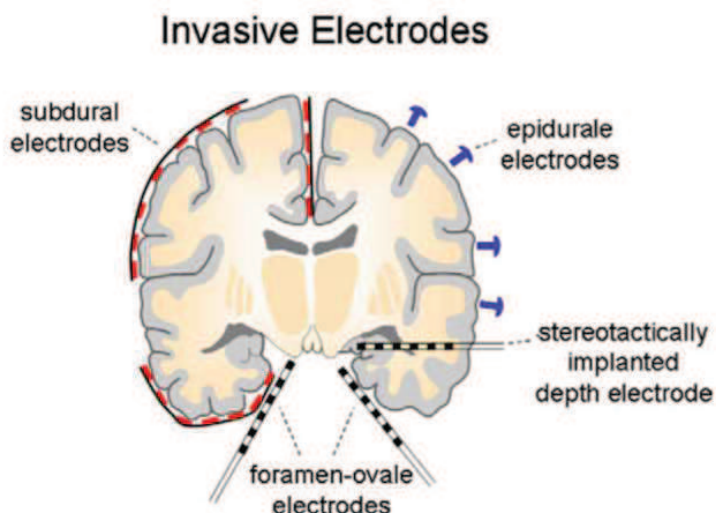
En dehors de l'hippocampe, le cortex entorhinal est une structure temporale qui peut également être lésée (Bernasconi et al., 1999). La diminution de son volume à l'examen IRM semble être corrélée à la durée de l'épilepsie (Salmenperä et al., 2000). De subtiles altérations neuropathologiques ont été rapportés sur des pièces opératoires issues de la chirurgie (Dawodu and Thom, 2005 ; Yilmazer-Hanke et al., 2000). Enfin des anomalies structurales ont été recensées au niveau du thalamus médian (Bertram et al., 2001 ; Juhasz et al., 1999). Il a été rapporté une atrophie thalamique corrélée à la durée de l'épilepsie (Natsume et al., 2003). Dans l'ensemble les anomalies extramésiales observées en imagerie ou en neurohistologie chez les patients ELT atteints de sclérose hippocampiques vont plus volontiers dans le sens d'une atrophie des structures néocorticales, thalamiques voire frontales (Bonilha et al., 2007 ; 2010a ; Keller and Roberts, 2008 ; Moran et al., 2001). Toutefois il faut noter qu'une récente étude post-mortem chez des patients atteints d'ELT semble indiquer des anomalies néocorticales que les auteurs suggèrent d'avantage en lien avec des blessures ou des anomalies développementales plutôt qu'une conséquence de circuits hyperexcitables intégrant l'hippocampe (Blanc et al., 2011). Par ailleurs, de nombreuses études de



connectivité fonctionnelle réalisées en IRMf-EEG rapportent des anomalies de connectivité au repos notamment entre structure mésiales, temporales et néocorticales (Ji GJ et al., 2013 ; Pittau F et al., 2012 ; Bettus G et al., 2009). Enfin une étude récente par analyse de texture en IRM, suggère une anomalie de différenciation entre substance blanche et substance grise au niveau du pôle temporal (Chassoux et al., 2004). Cette observation est régulièrement rapportée chez des patients atteints d'ELT sans sclérose, toutefois le plus souvent dans les cas d'ELT lésionnelle corticale de type tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale (TDN) ou de dysplasie corticale.

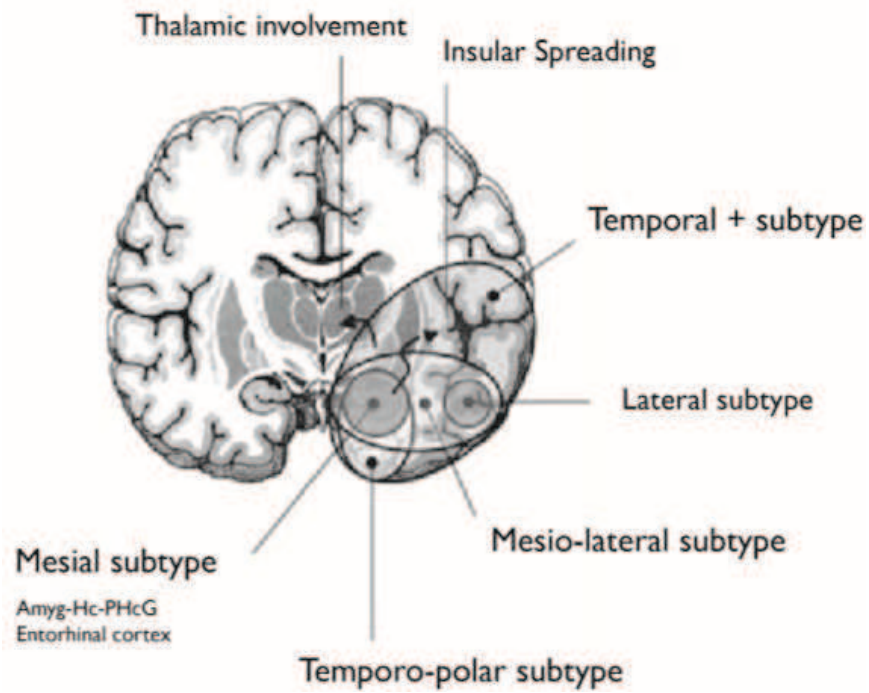
#### **4.3.3 Caractéristiques électro-cliniques des enregistrements EEG à l'aide d'électrodes profondes implantées chez des patients atteints d'ELTM**

L'intérêt principal de ces études est de permettre une localisation plus précise de l'origine des crises et donc une meilleure localisation de la zone épileptogène. Ces électrodes implantées stéréotaxiquement chez les patients permettent un enregistrement EEG continu et une identification des zones génératrices d'activités hypersynchrones (figure 15). Dans les cas d'ELTM avec sclérose de l'hippocampe, les enregistrements profonds semblent faire état d'une zone d'initiation des décharges critiques au sein de cette structure dans 20 à 65% des cas (Kahane et Bartolomei, 2010 ; Chabardès et al., 2005 ; King et al., 1997b ; Spanedda et al., 1997 ; Munari et al., 1994). Dans de nombreux cas, les décharges critiques prennent naissance dans l'amygdale ou simultanément dans l'amygdale et l'hippocampe. D'autres études semblent indiquer que d'autres structures du lobe temporal apparaissent comme de potentiels générateurs d'ondes hypersynchrones à l'origine des crises dont le gyrus parahippocampique (Wennberg et al., 2002) et le cortex entorhinal (Bartolomei et al., 2004, 2005, 2008 ; Spencer et Spencer, 1994). Enfin plusieurs autres études suggèrent une absence de foyer spécifique avec une initiation simultanée de plusieurs structures du lobe temporal (Mayanagi et al., 1996 ; King et al., 1997b ; Park et al., 1996). Dans l'ensemble les résultats issus d'enregistrements profonds suggèrent une plasticité fonctionnelle au sein du lobe temporal.



**Figure 15.** Les différents types d'électrodes pour l'enregistrement intracérébral (d'après, Noachtar et al., 2008)

Une revue parue en 2010 par Kahane et Bartolomei (2010) propose même une classification essentiellement basée sur les enregistrements stéréoEEG profonds (figure 16). Cette classification est basée sur une approche focale de la zone épileptogène et les données issues de la littérature tendant à revoir le rôle causal de la sclérose de l'hippocampe dans l'initiation des crises. Ainsi les auteurs proposent différents sous-types d'ELT chez les patients atteints de sclérose de l'hippocampe selon la localisation de la génération des décharges synchrones initiales ainsi que leurs caractéristiques électriques (voltage, fréquence): (i) le sous-type mésial (mesial subtype) pour lequel les décharges initiales prennent naissance dans les structures mésiales (amygdale, hippocampe, cortex entorhinal, gyrus parahippocampique) ; (ii) le sous-type temporopolaire au sein duquel les décharges prennent naissance dans le pôle temporal ; (iii) le sous-type mesiotemporal pour lequel une concomitance de décharge, le plus souvent de haute fréquence et de faible voltage, a lieu à la fois au sein des structures mésiales et du cortex temporal, ce groupe illustre la vision parfois trop souvent simpliste d'une séparation entre structures corticales et mésiales et suggère que le foyer épileptogène peut-être plus large ; (iv) le sous-type latéral où la crise semble débiter dans le néocortex temporal ; (v) le sous-type temporal plus comprend les cas où le réseau épileptogène est complexe provenant non seulement de structures temporales mais également d'autres aires telles que le cortex frontal, l'insula ou encore la jonction temporo-occipitale.



**Figure 16.** Proposition de classification de sous type d'ELT selon la topographie d'initiation des décharges observées sur les enregistrements intracérébraux profonds (d'après Kahane et al., 2010).

## 5. La Chirurgie de l'épilepsie

Les épilepsies pharmacorésistantes se définissent par la persistance de crises de nature épileptique certaine, suffisamment fréquentes et/ou délétères, malgré la prise régulière, depuis au moins deux ans, d'un médicament antiépileptique a priori correctement prescrit chez un patient compliant (Jallon, 2004). L'approche chirurgicale classique est dite curative ou d'exérèse (lobectomie, cortectomie, amygdalohippocampectomie) dont l'objectif est de guérir l'épilepsie en supprimant le ou les foyers épileptogènes. Le bénéfice de la chirurgie de l'épilepsie peut être évaluée selon la classification de Engel (Engel, 2001) suivante : (i) classe I, patients libres de crises ; (ii) classe II diminution des crises de plus de 90% ; (iii) classe III diminution de plus de 50% des crises ; (iv) classe IV peu ou pas de changements dans la fréquence des crises.

L'approche neurochirurgicale du traitement de l'épilepsie a évolué au cours des dernières décennies. Le début de la chirurgie rationnelle de l'épilepsie daterait de la 2<sup>ème</sup> moitié du XIX<sup>e</sup> siècle d'après l'article de Michel Weber intitulé « Histoire de la chirurgie de l'épilepsie : des origines au MNI » (Weber, 2007). Depuis la première amygdalohippocampectomie transcorticale rapportée par Niemeyer en 1958 différentes approches ont été utilisées. La première approche la plus fréquemment utilisée a été la lobectomie temporale antérieure (Yasargil et Wieser et al., 1993). Il a ensuite été proposé qu'une approche plus restrictive incluant une partie plus petite du lobe temporal combinée à une résection plus extensive des structures mésiales serait tout aussi efficace (résection de type Spencer ; Spencer et al., 1984). En 2001, Wiebe et al. (2001) démontrent que la chirurgie de l'épilepsie serait plus efficace que les traitements pharmacologiques chez les patients atteints d'épilepsie pharmacorésistante. En 1995, Wyler et al. (1995) rapportent que les chances de disparation des crises seraient d'autant meilleures que l'ensemble de l'hippocampe était réséqué. Un an après l'opération 69% des patients ayant subi une hippocampectomie totale n'avaient plus de crises alors que seulement 38% bénéficiaient de ce résultat après hippocampectomie partielle. Aucune différence d'un point de vue neuropsychologique n'était observée. A la suite de ces résultats s'est posée la question de la meilleure stratégie neurochirurgicale et de l'étendue de l'exérèse. Les déficits neuropsychologiques des patients s'améliorent le plus souvent mais peuvent parfois s'aggraver à la suite de la chirurgie (Milner et al., 1958 ; Hermann et al., 1992 ; Helmstaedter et al., 1996 ; Helmstaedter and Kurthen, 2001). Bien que le neurochirurgien soit le responsable de l'intervention, la définition de l'étendue de la résection est le plus souvent prise en commun avec l'épileptologue sur la base d'un bilan préchirurgical complet. Ce bilan préchirurgical est complexe et repose sur de nombreux examens cliniques, neuropsychologiques, électroencéphalographiques et

d'imagerie (Kurthen et al., 2008). Les tableaux 4 et 5 et la figure 17 ci-dessous résument la démarche préchirurgicale.

Manifestations initiales de la crise	Région cérébrale probablement impliquée
Aura épigastrique	Hippocampe
Aura olfactive	Uncus
Anxiété	Amygdales ou cortex frontomédian
Automatismes oro-alimentaires	Lobe temporal mésial
Aura auditives	Circonvolution temporale supérieure (postérieure)
Clonies focales unilatérales	Circonvolution précentrale
Phénomènes somato-sensibles focaux unilatéraux	Circonvolution postcentrale
Pseudo-hallucinations visuelles élémentaires	Cortex visuel occipital
Rires	Hypothalamus
Vertiges, sensation de lift	Cortex pariétal inférieur
Hypermotricité teintée d'affectivité	Cortex cingulaire

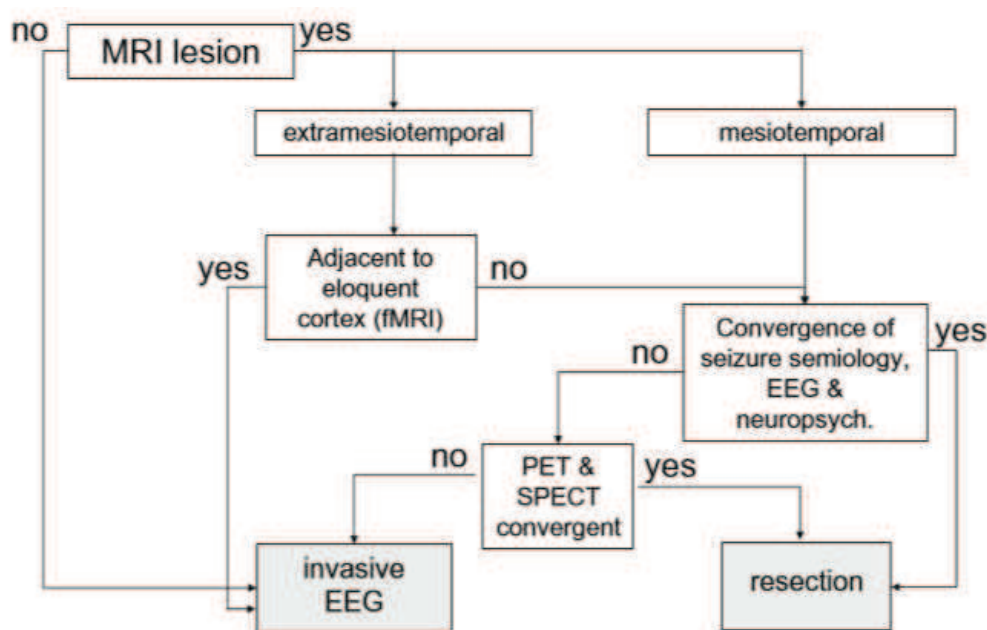
Il n'existe pas de classification claire des signes des crises et des régions du cerveau. Le recueil précis plus particulièrement des signes initiaux des crises fournit malgré tout une première hypothèse concernant la zone d'origine de ces dernières. Des éléments sémiologiques ne s'ajoutant que durant la crise indiquent plutôt la présence d'une extension de la région cérébrale responsable de la crise.

**Tableau 4.** Exemples d'éléments localisateurs dans la sémiologie des crises (d'après Kurthen et al., 2008).

Examen complémentaire	Observations classiques dans le MTLE
Anamnèse des crises (sémiologie)	Sémiologie mésiotemporale, notamment: automatismes oro-alimentaires précoces, position et regard fixes, maintien dystonique du bras controlatéral
IRM	Sclérose de l'hippocampe (diminution du volume, augmentation du signal dans les séquences T2 et FLAIR, relief superficiel dédifférencié, perte de la structure interne)
EEG interictal	Potentiels mésiotemporaux ou temporaux antérieurs typiquement épileptiques
EEG ictal	Activité rythmique de l'ordre de 5-9/sec. au niveau mésiotemporal ou temporal antérieur
Neuropsychologie	Troubles spécifiques au côté (gauche: verbal, droite: non verbal) de la mémoire épisodique
PET	Hypométabolisme temporal
SPECT	Hypoperfusion (interictale) ou hyperperfusion (ictale) temporale

La sémiologie des crises, l'EEG interictal et le cas échéant ictal, ainsi que les données de l'IRM sont essentiels pour le diagnostic de ce syndrome. Le diagnostic précoce est très important dans l'optique de la planification du traitement et l'information du patient; d'une part le MTLE est souvent pharmacorésistant et d'autre part une atteinte clairement unilatérale a de grandes chances de bénéficier grandement de la chirurgie avec une suppression complète des crises après amygdalohippocampectomie sélective (>70%).

**Tableau 5 :** Signes typiques en cas de syndrome d'épilepsie du lobe temporal mésial (MTLE) (d'après Kurthen et al. 2008).



**Figure 17.** Arbre décisionnel des explorations fonctionnelles pour le traitement chirurgical d'une épilepsie du lobe temporal (d'après Noachtar and Borggraefe et al., 2009).

### **Stratégie neurochirurgicale et pronostic à long terme**

Depuis la publication de Wyler et al. (1989), la tendance de nombreuses études a été de démontrer que plus la résection était large meilleur était le pronostic d'absence de crises à long terme. En effet sur un échantillon de 37 patients ayant subi une seconde opération suite à l'absence de guérison, Wyler et al. (1989) indiquent qu'une résection insuffisante de l'hippocampe était un facteur de mauvais pronostic. L'étude de Germano et al. (1994) va dans le même sens sur un effectif de 40 patients réopérés. Cette tendance s'est encore accentuée lorsque des études ont montré l'absence de conséquences neuropsychologiques d'une telle stratégie chez les patients souffrant d'ELT. Cependant les études de Kanner et al. (1995) et McKhann et al. (2000) semblent aller dans le sens inverse. Chez les patients atteints d' ELT pharmacorésistante pour lesquels une résection chirurgicale a été effectuée, 60 à 80 % des patients ont un intervalle de 2 ans sans crises (von Lehe et al., 2006 ; Janzsky et al., 2005 ). Les études portant sur de plus longues périodes suggèrent des résultats disparates mais dans tous les cas moins bons (Bien et al., 2013 ; de Tisi et al., 2011). McIntosh et al. (2001) avancent le chiffre de 50% après 5 ans et plus. Ces résultats suggèrent que l'ELT éligible à la chirurgie n'est pas un groupe homogène de syndromes et que les propriétés des réseaux hyperexcitables sont hétérogènes et qu'ils ne se limitent sans doute pas systématiquement aux structures temporales. Aussi ces données semblent confirmer les données

électroencéphalographiques et neuropathologiques de l'implication large du cortex temporal voire au-delà dans un circuit hyperexcitable (Blumcke et al., 2012 ; Bonilha et al., 2012 ; Kahane et Bartolomei, 2010 ). Ces résultats indiquent la nécessité de bien caractériser les syndromes épileptiques au préalable (Blumcke and Spreafico, 2012). Compte-tenu de la possibilité assez récurrente que les crises prennent naissance dans des structures adjacentes à l'hippocampe et l'amygdale, Bonilha et al. (2007) suggèrent qu'intégrer une résection du cortex entorhinal serait un facteur de meilleur pronostic.

Compte-tenu des enjeux économiques, sanitaires et de l'intérêt majeur de la stratégie neurochirurgicale de nombreuses études tentent de mettre en évidence des facteurs pronostiques afin de mieux cibler le profil des patients susceptibles de bénéficier de cette stratégie thérapeutique. De nombreux facteurs ont été étudiés au travers des nombreuses publications. Parmi ces très nombreux facteurs étudiés nous pouvons citer : l'âge des patients, la durée de l'épilepsie, la fréquence des crises, le type de crises (sémiologie, généralisation, dystoniques...), les antécédents de convulsions fébriles ou d'agression initiale, l'ictonographie cérébrale (IRM, PET), la sclérose des structures mésiales, l'anomalie extramésiale, l'exploration EEG et SEEG, la latéralisation, l'approche chirurgicale (amygdalohippocampectomie sélective, résection temporale...), le volume réséqué... Il est ainsi extrêmement difficile de prédire de manière fiable à l'avance une guérison pour les patients.

Il semblerait qu'un antécédent d'agression initiale (traumatisme, coma) soit un facteur favorable à la guérison (Mathern et al., 1995) de même que des antécédents de crises fébriles (Kanemoto et al., 1998). De même une sclérose limitée à l'hippocampe et non étendue à l'amygdale augmenterait les chances de voir disparaître les crises (80% contre 50%, Ho et al., 1998). Sur un total de 74 patients atteints d'ELT, Arruda et al. (1996) montrent qu'à un an le bénéfice (classe I ou II de Engel) d'un traitement chirurgical était de 93% chez les patients avec atrophie unilatérale de l'hippocampe, 61% chez les patients avec atrophie bilatérale et 50% chez les patients sans atrophie. Paglioli et al. (2004) ont montré chez 134 patients atteints d'ELT avec sclérose unilatérale de l'hippocampe que la résection chirurgicale permettait une absence de crises chez 60 à 80 % des patients à 10 ans de l'intervention. Une étude récente, longitudinale et prospective sur 18 ans réalisée sur un échantillon de 108 patients atteints d'ELT indique que 62% des patients étaient guéris (Hemb et al., 2013). Le risque de réapparition des crises dans les 24 premiers mois était de 22% et augmentait de 1,4% tous les ans. L'approche chirurgicale ne semble pas avoir eu d'impact sur les résultats observés (amygdalohippocampectomie sélective vs lobectomie temporale).

Toutefois une étude récente a tenté de soulever les conséquences neuropsychologiques d'une résection de tissu sains (Helmstaedter et al., 2011a). La même équipe a évalué dans le cadre d'une

amygdalohippocampectomie, les stratégies de résection courte (2,5 cm) ou longue (3,5 cm) de l'hippocampe (Helmstaedter et al., 2011b). Aucun impact n'a été observé sur la disparition des crises toutefois le volume d'hippocampe réséqué semble avoir des conséquences sur certaines fonctions mnésiques. Les performances mnésiques apparaissent inversement corrélées au volume d'hippocampe enlevé (plus le volume est grand plus les performances sont altérées). Dans une revue récente Bonilha et al. (2012) semblent indiquer que l'amygdalohippocampectomie et la lobectomie temporale antérieure sont des stratégies équivalentes du point de vue de la disparition des crises (Tanriverdi et Olivier 2007 ; Paglioli 2006 ; Clusmann et al., 2004 ; Arruda et al., 1996). Tanriverdi et al. (2008) suggèrent sur un échantillon de 256 patients, une absence de différence du point de vue de la guérison à un an entre une stratégie d'amygdalohippocampectomie et de corticohippocampectomie. Cette même équipe a montré qu'aucune de ces deux stratégies n'a d'effet sur les fonctions mnésiques (Tanriverdi et al., 2010). Le paramètre ayant eu le plus d'influence sur les fonctions neuropsychologiques est la latéralisation (résultat attendu). La différence entre ces deux types de stratégie doit toutefois être mieux évaluée sur le long terme. La revue de Schramm (2008) détaille l'intérêt des différentes stratégies neurochirurgicales.

Aujourd'hui encore une étude rétrospective fait référence. Il s'agit de l'étude de McIntosh et al. (2001) qui a analysée 126 articles entre 1991 et 2000. Cette revue cite 6 études ayant montré l'absence de bénéfice sur la disparition des crises suite à une résection étendue (au delà des structures mésiales) et deux études suggérant un résultat inverse. Les auteurs soulignent toutefois les différences d'approches méthodologiques entre les études notamment dans la sélection des patients (groupe hétérogène entre épilepsie temporale et extratemporale). L'étude rétrospective de Clusmann et al. (2002) ont comparé l'approche sélective d'amygdalohippocampectomie (SAH ; n=126) avec la lobectomie temporale (n=83) et rapportent une absence d'effets sur la survenue de crises postopératoires. Les auteurs rapportent cependant un bénéfice de la SAH du point de vue neuropsychologique notamment sur les fonctions attentionnelles et la mémoire verbale. Ainsi deux approches restent débattues l'une privilégiant toujours une résection étendue (Bonilha et al., 2012) et l'autre insistant sur le besoin de se limiter aux structures mésiales (Schramm et al., 2012) du fait de résultats équivalents sur les crises et d'une meilleure préservation des fonctions cognitives. Un consensus semble toutefois émerger sur la nécessité de continuer les études prospectives avec notamment une réévaluation radiologique postchirurgicale permettant une meilleure évaluation des volumes effectivement réséqués. Un autre élément proposé par Okonma et al. (2011) permettrait de réconcilier les deux approches en se basant non plus sur la disparition de crises d'un côté et sur les potentiels déficits cognitifs rencontrés par les patients de l'autre mais intégrer un facteur d'évaluation plus large tel un indice de qualité de vie des patients plus à même de représenter les



bénéfices et les inconvénients d'une telle chirurgie ressentis par les patients. Enfin l'étude réalisée par Janzsky et al. (2005) montre de façon assez robuste compte-tenu de la méthodologie employée et de l'échantillon de patients (171 patients au total) que la chirurgie doit être effectuée le plus tôt possible. La durée de l'épilepsie a été rapportée comme un facteur de mauvais pronostic sur la réapparition des crises à 5 ans.

## 6. Hypothèse neurométabolique de l'ELT

### 6.1 Arguments en faveur d'une hypothèse neurométabolique de l'ELT

La dépense énergétique cérébrale basale pour maintenir un potentiel membranaire et la génération d'activité électrique correspond à 80% de la dépense énergétique globale. Depuis plusieurs décennies de nombreux arguments plaident en faveur d'un dysfonctionnement métabolique avéré. Ce dysfonctionnement apparaît le plus souvent spécifiquement au sein de zones qualifiées d'épileptogènes. L'argument central de ce constat provient essentiellement des études en tomographie par émission de positons (TEP) permettant la mesure de la consommation en glucose des différentes structures cérébrales à l'aide du  $^{18}\text{F}$ -Fluorodésoxyglucose. Dans leur revue, Spencer et al. (1995) indiquent que selon la population de patient atteints d'ELT, cet examen permet parfois d'identifier les zones épileptogènes dans 80 à 90% des cas. De plus dans les cas d'EMLT, la spectroscopie RMN *in vivo* basée sur l'évaluation de la concentration en N-acétylaspartate (NAA) serait en mesure d'identifier ces mêmes zones avec une sensibilité comprise entre 70 et 100% (Connelly et al., 1994 ; Cendes et al., 1994 ; Vermathen et al., 2000 ; Simister et al., 2009). Le NAA est synthétisé principalement dans les mitochondries des neurones (Moffett and Namboodiri, 1995, 2006 ; Urenjack et al., 1992 ; Patel and Clark, 1979) et est directement corrélé au métabolisme oxydatif (Clark, 1998 ; Bates et al., 1996 ; Goldstein et al., 1969). De plus la diminution en NAA ne serait pas confinée aux zones épileptogènes mais plus largement dans différentes structures du réseau épileptique notamment l'hippocampe controlatéral et le thalamus ipsi et controlatéral (Hetherington et al., 2007). Enfin ce marqueur, semble avoir une dynamique dépendant de l'absence ou de la présence de crises épileptiques. Une réversibilité de la diminution de NAA a été observée au sein de l'hippocampe controlatéral des patients ayant bénéficié d'une intervention chirurgicale et chez lesquels l'absence de crises récurrentes a pu être observée (Simister et al., 2009 ; Serles et al., 2001 ; Cendes et al., 1997).

Un robuste indicateur du métabolisme cérébral est le rapport entre la phosphocréatine et l'adénosine triphosphate (PCr/ATP). Ces deux métabolites sont en équilibre et leur rapport serait un marqueur de l'équilibre énergétique cérébral. En période intercritique ce rapport a régulièrement été rapporté comme diminué chez les patients atteints d'ELT (Pan et al., 2005 ; Williamson et al., 2005). Dans leur article Pan et al. (2005) établissent par ailleurs une corrélation entre PCr/ATP et l'activité électrophysiologique des cellules du gyrus denté.

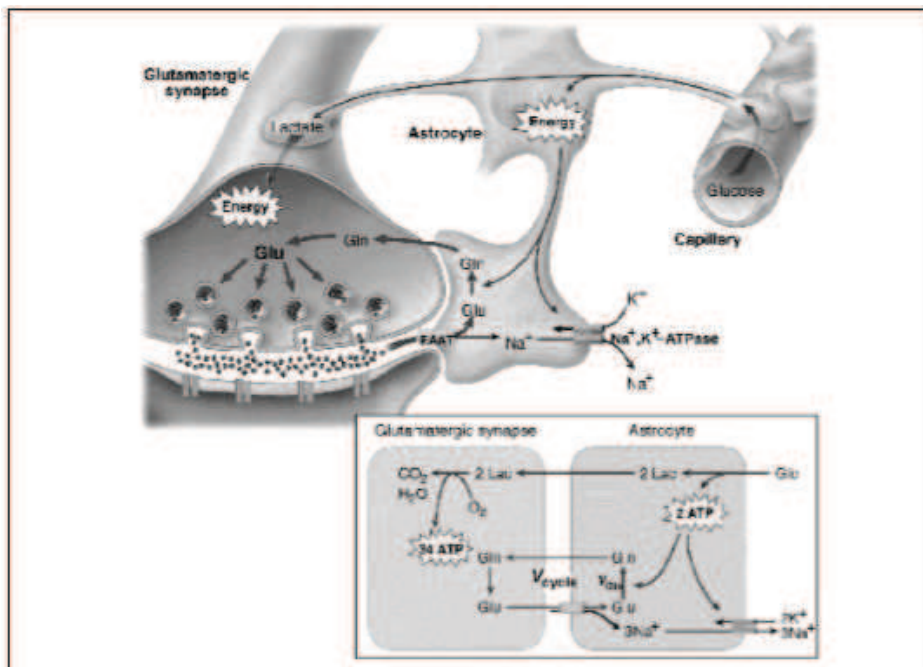
*Les études de micodialyse intracérébrale.* Un important travail de Doring et Spencer (1993) a permis pour la première fois d'effectuer une mesure de concentration intracérébrale de neurotransmetteurs chez des patients éveillés au cours d'une intervention chirurgicale. Des cathéters de micodialyse ont pu être couplés à des électrodes intracrâniennes. Une augmentation de glutamate extracellulaire a été mesurée pendant le déclenchement d'une crise et les seuils atteints étaient jugés neurotoxiques. Ce travail a été reproduit plus récemment par Cavus et al. (2005) et a pu être comparé à des résultats obtenus chez des patients non épileptiques. Une augmentation de glutamate a également été rapportée au niveau cortical sans toutefois être significative.

*Un rôle des mitochondries dans l'ELT ?* La voie métabolique principale de dégradation du glucose est appelée la glycolyse. Le glucose subit plusieurs transformations permettant la synthèse d'acétyl-CoA substrat entrant dans le cycle des acides tricarboxyliques (CAT). L'un des intermédiaires de ce cycle est l' $\alpha$ -cétoglutarate, précurseur de la synthèse de deux neuromédiateurs : la GABA et le glutamate. A chaque tour du CAT, pour une mole d'acétyl-CoA consommée, 4 moles de NADH et une mole de FADH<sub>2</sub> sont réduites. Le bilan énergétique final est la production de 2 moles d'ATP pour une mole de glucose. De plus la phosphorylation oxydative étape finale de la glycolyse, est localisée dans la membrane interne mitochondriale. Il s'agit d'une cascade de réactions d'oxydo-réduction catalysée par 4 complexes protéiques. Lors du transfert d'électron de NADH et FADH<sub>2</sub> vers l'accepteur final, l'oxygène, un gradient de protons est créé de part et d'autre de la membrane mitochondriale. Ce gradient permet la phosphorylation des dérivés de l'adénosine, catalysée par l'ATP synthétase. L'oxydation complète d'une mole de glucose permet la production de 36 ATP.

De nombreux éléments récents de la littérature suggèrent une contribution du stress oxydatif, des radicaux libres et plus généralement des dysfonctions mitochondriales dans la pathogénèse de l'épilepsie (revue de Folbergrova and Kuntz, 2012 ; Lin and Beal, 2006 ; Patel, 2004). Des anomalies au niveau de la chaîne respiratoire ont été décrites dans la région CA3 de l'hippocampe chez des patients atteints d'ELT avec sclérose de l'hippocampe (Vielhaber et al., 2008 ; Kuntz et al., 2000). Chez ces mêmes patients le niveau de fixation du [<sup>18</sup>F]-Fluorodesoxyglucose en TEP, reflet de la consommation en glucose, serait hautement corrélé avec l'activité de la chaîne respiratoire et l'oxydation de glucose associée (Vielhaber et al., 2003).

## 6.2 Métabolisme glio-neuronal

L'unité glio-neuronale est à présent bien décrite dans la littérature. Depuis une vingtaine d'années de nombreuses fonctions insoupçonnées ont pu être attribuées aux cellules gliales (figure 18). Les premiers éléments ont permis de comprendre le rôle fondamental de soutien énergétique apporté aux neurones. Il est actuellement reconnu que ces astrocytes ont la capacité de moduler la transmission synaptique (Volterra and Meldolesi, 2005). Elles semblent par ailleurs impliquées dans de nombreux autres processus (inflammation, neurodégénérescence, mémoire, etc...). Leur rôle dans la transmission glutamatergique est à présent bien décrit. Les anomalies de concentration en glutamate observées chez les patients sont des arguments suggérant un dysfonctionnement au sein de l'unité glio-neuronale. En effet le transporteur glial du glutamate (EAAT1, EAAT2) est le mécanisme de clairance principal de ce neurotransmetteur. En effet en 1999, Magistretti et Pellerin, ont fait part d'éléments déterminants suggérant un couplage entre métabolisme et neurotransmission. Leurs investigations (réalisées *in vitro*) indiquent que la glycolyse ayant lieu dans les astrocytes, ceux-ci participent activement à la recapture du glutamate avec pour conséquence la production de lactate, métabolite secondairement transféré à nouveau aux neurones.

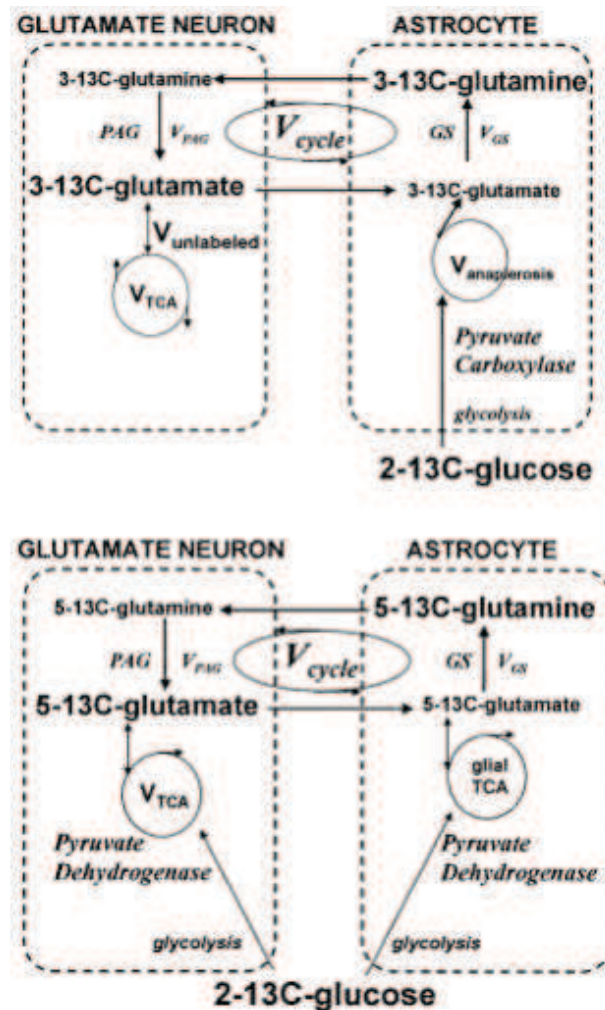


**Figure 18.** Couplage métabolique astrocyte/neurone. Par le biais du glutamate, l'activation neuronale active la glycolyse anaérobie astrocytaire. Ceci conduit à la formation de lactate qui pourra être en retour utilisé dans le compartiment neuronal (d'après Magistretti, 1999).

Depuis la revue de Schousboe et al. (1992) et les nombreux travaux qui ont suivi, il semble que le couplage entre métabolisme et neurotransmission soit établi. Ce couplage est essentiellement dépendant du cycle glutamate/glutamine ayant cours au sein de l'unité glio-neuronale. Le glutamate recapté spécifiquement par les cellules gliales est transformé en glutamine via la glutamine synthétase. La glutamine est à son tour convertie en glutamate par le neurone via la glutaminase. Ce cycle suggère un flux directionnel pour le glutamate, neurotransmetteur le plus abondant au niveau cérébral. Par la suite il a été montré que le GABA est également impliqué dans le cycle glutamate/glutamine. Le GABA est par la suite recapté par les transporteurs du GABA (GAT) présents sur la membrane présynaptique des neurones et au niveau des astrocytes. Le GABA est ensuite partiellement transformé en succinate. Bien que la voie gliale du glutamate (recapture et entrée dans le cycle glutamate/glutamine) ait été bien établie notamment à l'aide d'études autoradiographiques (Nehlig et al., 2004 ; Nehlig and Coles, 2007) son couplage métabolique et son lien avec le domaine de la « neuroénergétique » est apparu plus tardivement (Rothman et al., 2011). Le concept prédominant était que la majeure partie des stocks de glutamate se trouvait à l'intérieur de vésicules, lesquelles n'interagissaient pas avec le métabolisme. Une des premières études en spectroscopie RMN chez l'homme utilisant des substrats marqués au carbone 13 a permis de remettre en cause cette vision (Gruetter et al., 1994). En effet cette approche est actuellement la seule méthode non invasive permettant l'étude du statut neuroénergétique cérébral et des cycles métaboliques des acides tricarboxyliques associés dont le cycle glutamate/glutamine fait partie. Le recours à la spectroscopie RMN du carbone 13 permet en effet de modéliser les liens entre le cycle glutamate/glutamine et l'oxydation neuronale du glucose.

Cette modélisation peut être réalisée grâce à l'administration de substrats marqués au carbone 13 tels que le  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose (figure 19). Par l'intermédiaire d'une analyse compartimentale basée sur les signaux obtenus des différents isotopomères issus du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose, la vitesse d'apparition de ces isotopes peut être modélisée (en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Il en découle l'évaluation des flux métaboliques de chacun des cycles dans chacun des compartiments (astrocyte et neurone). Petrof et al. (2002) ont mis à profit cette approche chez des patients atteints d'ELT pharmacorésistance. Quelques heures avant une intervention neurochirurgicale, une solution injectable à 20% de glucose marqué au carbone 13 était administrée ( $[1-^{13}\text{C}]$ glucose). Après le début de l'infusion, la glycémie était mesurée toutes les 30 minutes. L'intervention neurochirurgicale permettait par la suite d'obtenir des pièces de résection enrichies en carbone 13. Ces pièces opératoires étaient ensuite analysés *ex vivo* par spectroscopie RMN liquide à haut champ. L'ensemble de ces mesures combinées a permis de modéliser le cycle glutamate/glutamine, la vitesse de synthèse du glutamate, la vitesse du cycle des acides tricarboxyliques et la vitesse de synthèse de la glutamine à l'état d'équilibre. Les corrélations

ont été établies en fonction du statut neurohistologique des patients. Les auteurs rapportent un rapport entre le cycle glutamate/glutamine sur le cycle tricarboxylique beaucoup plus faible chez les patients présentant une sclérose de l'hippocampe par rapport aux patients présentant des pertes neuronales minimales. Les auteurs concluent à un faible *turn-over* du cycle glutamate/glutamine au sein de l'hippocampe imputable aux cellules gliales. Ce faible *turn over* aurait comme conséquence une clairance altérée du glutamate contribuant ainsi à un état hyperexcitable voire épileptogène.



**Figure 19 :** Modèle métabolique proposé par Petroff et al. (2002b) pour l'interprétation des données RMN après perfusion à l'aide de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. Le schéma du bas illustre la voie métabolique  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose dans le neurone et l'astrocyte par la voie de la pyruvate déshydrogénase. Le schéma du haut la voie anaplerotique de l'astrocyte via la pyruvate décarboxylase. L'intégration du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose engendre la synthèse de métabolites marqués détectables. Il est ainsi possible de modéliser les vitesses des différents cycles selon leur compartiment. GS : glutamine synthétase ; PAG : phosphate-activated glutaminase ; TCA : cycle des acides tricarboxyliques ; V : vitesse des différents cycles ou enzyme indiquée en indice (d'après Petroff et al., 2002)

### 6.3 Apport de la SRMN à l'exploration physiopathologique de l'ELT

#### 6.3.1 Généralités sur la RMN

Actuellement la spectroscopie RMN est très largement répandue et contribue, en routine clinique, à l'étude de nombreuses pathologies cérébrales : tumeurs cérébrales, sclérose en plaques, maladies métaboliques, hypoxie cérébrale, lésions de nature indéterminée (kyste lésionnel ou infectieux (Scheau et al., 2012)). Le recours à cette technologie connaît un intérêt croissant pour certaines pathologies neurodégénératives (Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique) et neuropsychiatriques (schizophrénie, démence). La nature des anomalies métaboliques restant à caractériser, la spectroscopie RMN tient un rôle de choix dans l'exploration de la physiopathologie de l'ELT. Cette technique est ainsi applicable à l'homme en complément d'autres méthodes d'exploration non invasive comme la TEP ou l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). La TEP permet une résolution spatiale de l'ordre du mm pour l'imagerie métabolique (cas du [<sup>18</sup>F]-Fluorodésoxyglucose) ou l'étude de l'expression d'un récepteur ou d'un transporteur spécifique à l'aide d'un radioligand. Cependant un avantage majeur de la spectroscopie RMN est la possibilité de détecter simultanément plusieurs métabolites ce qui est impossible en TEP du fait de la non spécificité de la radioactivité détectée. L'information exploitée en spectroscopie RMN prend la forme d'un spectre de raies de résonance correspondant à une série de métabolites. Une limitation de la spectroscopie RMN reste sa sensibilité relative. En effet il s'agit d'une méthode de mesure macroscopique, le volume de détection englobe au minimum des centaines de milliers de cellules. Malgré cette caractéristique elle permet d'étudier des phénomènes qui se déroulent à l'échelle moléculaire comme l'inhibition d'une enzyme ou l'étude d'une voie métabolique. La spectroscopie RMN du cerveau a connu un développement important depuis une trentaine d'années (Gruetter et al., 1998). Des apports méthodologiques majeurs ont émergé dans le domaine avec l'apparition d'aimants à haut champ, autorisant un rapport signal sur bruit nettement plus favorable, une amélioration de l'électronique de détection et des gradients associés, de nouvelles séquences RMN associées à des techniques de quantification performantes ont été mises au point. L'intérêt des hauts champs sur la résolution spectrale a conduit au développement d'investigations par spectroscopie RMN *ex vivo*. Il s'agit d'étudier les tissus cérébraux de patients épileptiques issus de la chirurgie. Ce type d'approche a recours à des spectromètres classiquement utilisés en chimie. Ce type d'équipement est très largement répandu. Des aimants de 4,7 T (200Mhz) à 11,7 T (500 MHz) voire 18,8 T (800 Mhz) sont classiquement implémentés sur ce type de spectromètre. Cependant pour ce type d'analyse il est nécessaire de travailler dans un milieu homogène, typiquement une

solution. Ainsi l'étude d'échantillons cérébraux par spectroscopie RMN nécessite au préalable un traitement permettant l'extraction des métabolites d'intérêt en phase liquide puis dans un second temps l'analyse à proprement parler. La RMN HRMAS s'affranchit de cette étape d'extraction et à ce jour aucune étude de ce type n'a été réalisée sur des pièces opératoires issues de la chirurgie de l'épilepsie.

### 6.3.2 Apports de la spectroscopie RMN *In vivo*

La spectroscopie RMN *in vivo* offre la possibilité de réaliser de nombreuses études aussi bien qualitatives que quantitatives permettant des investigations sur les processus biochimiques en lien avec la physiopathologie de l'épilepsie. La première étude en spectroscopie RMN *in vivo* chez des patients épileptiques a été réalisée en 1992 par Hugg et al. (1992). Par le biais de la spectroscopie du phosphore 31, le but de cette étude était d'objectiver la latéralisation des anomalies métaboliques de patients atteints d'ELT pour lesquels une anomalie morphologique était visible en IRM. Une augmentation de phosphate inorganique a été observée ainsi qu'une diminution des phosphomonoesters. Ainsi depuis plus d'une vingtaine d'années de nombreuses études ont été publiées, Hajek (2008) rapporte plus de 770 papiers sur le sujet en 2007 (recherche medline, mots clés : nmr and spectroscopy). Ces investigations se sont focalisées sur certains métabolites « visibles » en spectroscopie RMN *in vivo* dont les plus étudiés sont : le N-acétylaspartate (NAA), la créatine (Cr), la phosphocréatine (PCr), les cholines (phosphocholine, PCho et glycerophosphocholine, GPC), le glutamate (Glu), la glutamine (Gln), l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), le lactate (Lac). La nature des anomalies métaboliques restant à caractériser, la spectroscopie RMN tient un rôle de choix dans l'exploration de la physiopathologie de l'ELT. Les questions principales ayant guidé les études en spectroscopie RMN sont les suivantes :

- La spectroscopie RMN peut-elle contribuer à la localisation des zones épileptogènes ?
- Les traitements médicamenteux modifient-ils les concentrations en métabolites ?
- Existe-t-il des corrélations électro-cliniques avec certains métabolites (durée de la maladie, nombre de crises, types de crises..) ?
- Y-a-t-il des modifications après traitement neurochirurgical ?



La plupart des études se sont focalisées sur les régions mésiales de patients atteints de sclérose de l'hippocampe. La revue de Hajek et al. (1998) bien qu'ancienne présente le bilan des premières études chez des patients atteints d'ELT. Le tableau 6 présente une partie des études menées depuis la publication de cette revue. Par ailleurs Wilmmann et al. (2006) ont réalisé une méta-analyse de l'intérêt préopératoire de la spectroscopie *in vivo* pour la localisation de la zone épileptogène. Il ressort de ces travaux qu'une diminution de NAA était le plus souvent observée et accompagnée de diminutions des ratios NAA/Cr, NAA/Cho et NAA/(Cr+Cho).

**Tableau 6.** Présentation d'études réalisées en SRMN *in vivo* chez des patients atteints d'ELT depuis la revue de Hajek et al. (1998). Abbreviations : CDV: champ de vue; EPSI : Echo-Planar Spectroscopic Imaging ; IRP-FSPGR : Inversion Recovery Prepared FaSt Spoiled Gradient Echo; MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy; PRESS: Point Resolved Spectroscopy; T: Tesla; TE: temps d'écho; TI : temps d'inversion ; TR: temps de répétition.

Etude	Patients / populations/ effectifs	Buts	Métabolites étudiés	Méthodes Instruments quantification	Résultats
<b>Mueller et al., 2011</b>	Patients ELT SH+ (n=12) Patients ELT SH- (n=13) Sujets contrôles (n=18)	- Différences extrahippocampiques ELT SH+ et ELT SH- - Eléments de latéralisation ?	Rapport NAA / (Cr + Cho)	<sup>1</sup> H RMN séquence EPSI 4 T CDV : 280x180x180 mm <sup>3</sup> Résolution: 1 x 1 x 1 mm <sup>3</sup> TR/TE/TI = 1,780/45/280ms Traitement statistique via SPM2	ELT SH+ et ELT SH- réduction significative du rapport NAA/ (Cr+Cho) par rapport aux sujets contrôles. Large variation interindividuelle Valeur de latéralisation faible
<b>Vermathen et al., 2000</b>	Patients ELT pharmacorésist ante (n=9) Sujets contrôles (n=14)	Déterminer les variations en métabolites en fonction des sous régions hippocampiques	NAA / (Cr + Cho)	<sup>1</sup> H MRS séquence PRESS 1,5 T TR/TE: 1,8/135 ms CDV: 15x105x70 mm <sup>3</sup>	Rapport NAA/Cr+Cho diminué dans l'hippocampe antérieur compare à l'hippocampe postérieur. Observation similaire chez les patients ELT. Les rapports sont diminués dans le groupe TLE compare au sujets témoins.
<b>Hammen et al., 2008</b>	Patients ELT pharmacorésist ante (n=23)	Corrélation concentration en métabolites et statut histologique	NAA m-Ins	<sup>1</sup> H MRS séquence PRESS 1,5 T TR/TE: 3000/30 ms CDV: 2x20x10 mm <sup>3</sup> Quantification avec LC-model	Corrélation retrouvée pour - Diminution de NAA et densité neuronale (CA1, CA3, CA4, gyrus denté) - M-Ins et GFAP
<b>Simister et al., 2009</b>	Patients ELT pharmacorésist ante HS+ avant chirurgie (n=16) Patients ELT pharmacorésist ante HS+ après chirurgie (n=10) Sujets contrôles (n=15)	Suivi avant et après chirurgie	NNA, GABA, PCr, Cr, GLX	<sup>1</sup> H MRS séquence IRP-FSPGR 1,5 T TR/TE/TI: 16/4.2/450 ms CDV: 240 x 156 x 1.5 mm	Avant chirurgie: NNA/Cr diminué chez les patients ELT GLX/Cr et GABA/Cr normaux Après chirurgie: Normalisation du rapport NNA/Cr
<b>Simister et al., 2002</b>	Patients ELT pharmacorésist ante HS+ (n=10) Patients ELT pharmacorésist ante HS- (n=10) Sujets contrôles (n=10)	Concentrations en métabolites dans les structures temporomésiales (antérieures, postérieures) et au sein du cortex temporal latéral en fonction du statut histologique de l'hippocampe (avec et sans sclérose)	NAA NAAat, Cr, Cho, Glx, mIns	<sup>1</sup> H MRS séquence IRP-FSPGR 1,5 T TE: 30 ms ; TR: 3000 ms CDV: 260 x 260 x 12 mm Voxel 2 mm <sup>3</sup> Quantification avec LC model	In the HPC sclerosis group 7/10 had low NAA. In the MRI groups 4/10 had low NAA. Diminution de NAA, Cr, Cho dans les structures mésiales antérieures chez les patients ELT HS+. Diminution de NAA et augmentation de GLX dans le cortex temporal latéral des patients TLE HS-.

## 6. Hypothèse neurométabolique de l'ELT

<b>Woermann et al., 1999</b>	Patients ELT HS+ (n = 15) Patients ELT HS- (n = 15) Sujets contrôles (n = 15)		NAA, Cr, Cho, Glx, mIns	<sup>1</sup> H MRS séquence PRESS 1,5 T TE: 30 ms ; TR: 3000 ms Quantification LC model	12 patients ELT HS+ sur 15 ont une concentration en NAA diminué (pour trois patients ce résultat était retrouvé dans l'HPC controlatéral) 7/15 ELT HS+ ont un rapport NAA/mIns diminué dans l'HPC par rapport aux deux autres groupes. Dans le groupe ELT HS- seulement 4/15 avait une diminution de NAA Glx était augmentée dans le groupe ELT HS- par rapport aux sujets contrôles.
<b>Hajek et al., 2009</b>	Patients ELT (n = 35) Dont 19 SH+ « classique » Et 16 SH+ « légère »	Etude de la latéralisation et analyse par sous groupes en fonction du statut histologique de l'hippocampe (sclérose « classique » et « légère »). Corrélation avec la clinique, l'imagerie et le résultat de la chirurgie	NAA Cr Cho	<sup>1</sup> H MRS séquence PRESS 1,5 T TE: 135 ms ; TR: 5000 ms: CDV : 3-5 mL Quantification via LC Model	Une latéralisation était retrouvée pour 83% des patients TLE. Pas de différences au sein des sous-groupes sclérose de l'hippocampe. Les résultats issus de la spectroscopie ne semblent pas être corrélés au statut histopathologique de l'hippocampe (pas de corrélation avec les pertes cellulaires)
<b>Li et al., 2000</b>	Patients ELT (n = 21) Patients Extra-ELT (n = 20) Patients multilobaires (large zone épileptogène ; n = 10) Groupes définis sur la base des EEG	Evaluer l'extension spatiale de la diminution du rapport NAA/Cr	NAA/Cr	<sup>1</sup> H MRS séquence PRESS 1,5 T TE: 130 ms ; TR: 3000 ms CDV: 250 x 250 mm Voxel : 1 x 1 x 1,2 cm	96 % des patients ELT avaient une diminution du rapport NAA/Cr Diminution observée chez 50% des patients extra-ELT et 60% des patients multilobaires Aucune corrélation avec la durée de l'épilepsie et la fréquence des crises. 50% des patients avaient des atteintes morphologiques au delà de la zone épileptogène
<b>Fountas et al., 2012</b>	Patients ELT HS+ (n=23)	Profil spectroscopique de l'hippocampe sclérotique corrélé aux analyses histopathologiques	NAA, Cho, Cr	<sup>1</sup> H MRS séquence PRESS 1,5 T	Diminution de NAA, augmentation de Cho et Cr pour 65% des patients. NAA/Cho et NAA/Cr diminués pour 69% des patients Sensibilité de la spectroscopie 100% en regard des analyses histopathologiques (Association entre anomalie histopathologiques et résultats spectroscopiques)
<b>Campos et al., 2010</b>	Patients ELT répondeurs d'emblée à une monothérapie par AE (n= 25) Patients ELT non répondeurs (n = 21) Sujets contrôles (n = 27)	Comparer les concentrations en NAA entre les deux groupes de patients	NAA, CR	<sup>1</sup> H MRS PRESS 1,5 T TE: 15 ms ; TR: 1500 ms CDV: 250 x 250 mm Voxel : 2 x 2 x 2 cm	NAA/Cr diminué bilatéralement dans l'hippocampe du groupe non répondeur vs contrôle et vs répondeur. NAA/Cr plus souvent diminué chez les patients non répondeurs.

Les études plus récemment menées confirment que dans la majorité des cas une diminution du NAA a été retrouvée chez les patients atteints de sclérose de l'hippocampe (Simister et al., 2003 et 2009 ; Hammen et al., 2008 ; Li et al., 2000). Ce résultat est moins fréquemment retrouvé chez les patients sans sclérose de l'hippocampe (Woermann et al., 1998 ; Simister et al., 2002). Une corrélation a été établie entre la diminution de NAA et l'atrophie de l'hippocampe évaluée par la densité neuronale en histopathologie par Hammen et al. (2008) et contre dite par Hajek et al. (2008). Doelken et al. (2008) rapporte que les variations de NAA dépendent de la présence ou non d'une sclérose de l'hippocampe. Dans le même temps une absence de corrélation a été observée entre volume de l'hippocampe (évalué en IRM) et concentration en NAA (Kuzniesky et al., 1998a). De plus cette diminution est inconstamment observée dans les structures temporales extramésiales (Mueller et al., 2011 ; Simister et al., 2003). La diminution du NAA semble davantage toucher la partie antérieure de l'hippocampe (Simister et al., 2003 ; Vermathen et al., 2000). Li et al. (2001) précisent que cette diminution du NAA n'est pas corrélée avec la durée de l'épilepsie ni avec la fréquence des crises alors que pour Duc et al., (1998) à un âge identique de début des crises, la diminution en NAA est corrélée à la durée de l'épilepsie. La concentration en NAA pourrait être influencée par la fréquence des crises (Bernasconi et al., 2002 ; Namer et al., 1999). Ende et al. (1997) rapporte que cette diminution de NAA serait également présente dans l'hippocampe controlatéral chez 50% des patients étudiés. Ce résultat original suggère que la diminution de NAA n'aurait pas pour seule origine une atrophie de l'hippocampe. A la même période Vermathen et al. (1997) montrent qu'une diminution de NAA au niveau de l'hippocampe n'est pas retrouvée chez les patients atteints d'épilepsie néocorticale. Combinant spectroscopie RMN et enregistrement stéréocéphalographiques profonds, Guye et al. (2002) montrent qu'une diminution de NAA est présente dans toutes les régions temporales où sont enregistrées des anomalies critiques et intercritiques. Les auteurs suggèrent que les anomalies métaboliques observables en spectroscopie RMN seraient d'avantage liées aux décharges épileptiformes qu'aux anomalies morphologiques observables en IRM, lesquelles ne se recoupent que partiellement d'un point de vue topographique (typiquement sclérose de l'hippocampe). Dans l'ensemble ces résultats reflètent de manière assez fidèle la difficulté à caractériser les anomalies métaboliques non pas au sein de structures définies mais au sein d'un réseau. Enfin des auteurs rapportent une normalisation du rapport NAA/Cr dans le lobe temporal controlatéral après résection neurochirurgicale des zones épileptogènes (Cendes et al., 1997 ; Hugg et al., 1996 ; Serles et al., 2001 ; Simister et al., 2009). Suhy et al. en 2002 rapportent que la spectroscopie RMN *in vivo* serait capable de prédire le succès d'un traitement neurochirurgical de l'ELT chez des patients pour lesquels aucune anomalie morphologique n'a été détectée. Deux ans après l'intervention, le rapport NAA/(Cr+Cho) de l'hippocampe ipsi et controlatéral était inférieur chez les patients continuant à subir des crises récurrentes comparé à des patients n'ayant plus de

crises. Ces résultats semblent rendre compte d'anomalies métaboliques dynamiques au sein des réseaux épileptiques.

D'autres métabolites ont été évalués en spectroscopie RMN chez les patients épileptiques (GABA, glutamate/glutamine, choline, myoinositol) toutefois le nombre de publications est nettement inférieur et les résultats semblent moins robustes. Simister et al. (2009) rapportent une absence de différence significative entre sujets contrôles et patients atteints d'ELT pour le rapport GABA/Cr et glutamate+glutamine/Cr. Cette même équipe avait rapporté une élévation de glutamate+glutamine dans les épilepsies frontales (Simister et al., 2003). Cependant toujours la même équipe, a rapporté une augmentation de glutamate+glutamine au niveau temporal spécifiquement chez les patients ELT sans anomalie à l'IRM (Simister et al., 2002). Ce résultat avait déjà été rapporté par Woermann et al. (1998). De plus dans cette même étude l'index myoinositol/NAA était significativement diminué chez patients ELT (avec ou sans sclérose de l'hippocampe).

Ainsi les études spectroscopiques du métabolisme cérébral des patients ELT mettent en évidence des anomalies quantitatives pour certains métabolites non seulement dans les structures mésiales mais également de façon plus large dans le lobe temporal ipsi et controlatéral. Ces anomalies semblent essentiellement dépendantes de critères iconographiques, neuropathologiques voire cliniques (IRM négative, absence ou présence de sclérose). Ces résultats illustrent également la difficulté de décrire au mieux la circuiterie épileptique dont la plasticité et la dynamique rendent ces observations difficiles à interpréter. Ces études souffrent toutefois de biais méthodologiques : nombre de patients assez restreint, étiologies des ELT le plus souvent variables, absence de statistiques multivariées.

### 6.3.3 Apports de la spectroscopie RMN *ex vivo*

La chirurgie de l'épilepsie est pratiquée depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle. Les pièces opératoires de résection restent une opportunité unique d'investigation pour la compréhension de la physiopathologie de la maladie. De nombreuses investigations sont possibles sur ce type de matériel : marqueurs immunohistochimiques (transporteurs, récepteurs, autres marqueurs protéiques...), études électrophysiologiques *ex vivo*, analyse protéomique, hybridation in-situ, dosage des neurotransmetteurs... Nous détaillerons dans un premier temps spécifiquement les études en rapport avec l'analyse des acides aminées qui semblent les plus pertinentes en regard des travaux rapportés dans ce document. Une des premières investigations a été réalisée par Van Gelder et al.

(1972), cette équipe a mesuré différents acides aminés au sein de zones qualifiées d'épileptogènes et dans les structures adjacentes. L'étiologie épileptique des patients inclus dans cette étude était assez variable, les résultats rapportés suggèrent une diminution du GABA et de l'acide aspartique dans toutes les aires cérébrales analysées. Les zones épileptogènes avaient spécifiquement des concentrations diminuées en glutamate, en acide aspartique et en taurine. Les auteurs suggèrent un découplage métabolique entre l'oxydation du glucose et le métabolisme protéique plus ou moins étendu à l'ensemble du cortex. Par la suite Perry et al. (1975) indiquent l'absence d'anomalie quantitative au sein de tissus épileptiques. Quelques années plus tard le même auteur publie une nouvelle étude (Perry et al., 1981a). Cinquante quatre échantillons de tissus cérébraux issus de 35 patients présentant une épilepsie temporale ou frontale sont analysés. Tous les patients étaient traités par antiépileptiques au moment de l'intervention. Des enregistrements cérébraux profonds ont contribué à la définition de la zone épileptogène. Les auteurs rapportent une absence de différence significative pour une trentaine d'acides aminés entre foyers épileptogènes et cortex adjacents. Cependant comparés à des échantillons « contrôles » ceux issus de foyers épileptiques présentaient une concentration significativement augmentée en GABA, glutamate, glutathion et glycine. La méthodologie de dosage de ces métabolites était des « analyseurs » d'acides aminés. Par la suite Scherwin et al. (1988) ont évalué la concentration en acides aminés de structures cérébrales qualifiées de déchargeantes (« spiking cortex ») et non déchargeantes (« not spiking cortex ») à l'aide de la stéréocéphalographie profonde. Le glutamate, l'aspartate et la glycine semblent significativement plus élevés au sein des cortex déchargeants alors qu'aucune différence significative n'a été observée pour le GABA et la taurine. La plupart des patients épileptiques étaient sous traitement antiépileptique au moment de la chirurgie. Il n'y avait aucune corrélation entre ces concentrations et le grade histologique ou le traitement épileptique. Il n'y avait pas de différence attribuable à l'âge, au sexe ni à la latéralisation des foyers.

L'équipe de Petroff en 1989 a été la première équipe à mettre à profit la spectroscopie RMN à haut champ pour l'étude métabolique de tissus cérébraux épileptiques issus de la chirurgie. Les auteurs avaient pour but de caractériser le profil métabolique de la substance grise corticale et de la substance blanche des aires temporales et frontales. Pour les premières acquisitions de ce type 10 patients épileptiques ont participé à l'étude. L'analyse a été réalisée sur un spectromètre Bruker 500 MHz. Les pièces opératoires ont subi une étape d'extraction des métabolites par hydrolyse acide (acides chlorhydrique et perchlorique). Après centrifugation, le surnageant est récupéré le pH de la solution est ensuite corrigé pour l'amener entre 7 et 8. Les résultats rapportés pour 19 métabolites apparaissent proches d'autres résultats déjà publiés (Perry et al., 1971a, 1971b, 1975, 1981a, 1981b ; Van Gelder et al., 1972). Pelling et al. (1993), rapportent une étude réalisée avec 16 patients

souffrant d'épilepsie pharmacorésistante et traités par une approche d'hémisphérectomie partielle. Cette étude reprend la méthodologie de Scherwin et al. (1988) dans la mesure où il s'agissait d'analyser les tissus epileptogènes issus de la chirurgie en fonction de leur statut électrophysiologique (« spiking foci » vs « non spiking foci »). Une corrélation a également été recherchée en fonction du statut histologique de l'hippocampe (présence ou absence de sclérose). Comparé au profil métabolique issu des aires néocorticales, les auteurs rapportent une augmentation des concentrations en Ins, Tau et une diminution en Asp, NAA, Glu au sein des hippocampes indépendamment de leur statut histologique. Le GABA et le succinate sont diminués spécifiquement dans les hippocampes avec sclérose (sur un nombre relativement restreint de patients : 6 patients avec sclérose de l'hippocampe et 10 sans sclérose de l'hippocampe). Toujours l'équipe d'Ognen Petroff rapporte en 1995 (Petroff et al., 1995) une étude similaire complétée par l'étude de préparations spécifiques (synaptosomes, gliosomes, neurosomes). Les échantillons issus de patients épileptiques présentent un rapport NAA/Cr diminué chez les patients présentant une épilepsie temporale mésiale, le glutamate et le GABA étaient augmentés dans les aires corticales. Le NAA était effectivement diminué dans les tissus épileptiques.

En 1999, Aasly et al. (1999) de l'université de Trondheim ont publié une nouvelle étude regroupant 17 patients atteints d'épilepsie pharmacorésistante (EPR) temporale avec et sans lésion morphologique du néocortex (7 avec sclérose mésiale, 4 dysplasies corticales, 3 scléroses tubéreuses, 2 astrocytomes et un cavernome). Les biopsies contrôles étaient issues de patients opérés pour des tumeurs cérébrales ou des malformations vasculaires. Les résultats ont été regroupés par type de patients. Les résultats sont relativement différents selon les groupes par rapport aux biopsies contrôles toutefois avec des effectifs restreints. Le tableau 7 ci-après reprend les résultats rapportés. Par ailleurs les auteurs rapportent l'absence de corrélation entre le traitement antiépileptique au moment de l'intervention et la concentration en GABA.

Table 2  
Concentrations of metabolites in brain biopsies as measured by proton magnetic resonance spectrometry (MRS)<sup>a</sup>

Metabolite	Control (n = 7)	Gliosis (n = 7)	Cortical dysplasia (MCD), (n = 4)	Tuberous sclerosis (n = 3)
NAA	131.2 ± 12.1	103.2 ± 10.2	35.6 ± 15.0*	35.5 ± 15.5*
GABA	21.6 ± 3.9	28.1 ± 6.2	97.1 ± 8.4*	57.0 ± 22.3*
Glutamate	190.9 ± 22.6	176.4 ± 20.2	195.3 ± 14.3	116.2 ± 28.9
Glutamine	100.0 ± 14.4	100.7 ± 12.7	120.9 ± 18.6	81.4 ± 30.8
Alanine	11.8 ± 1.4	17.7 ± 2.9	88.3 ± 12.1*	34.4 ± 19.1
Tyrosine	1.2 ± 0.4	4.2 ± 2.6	34.1 ± 6.0*	13.0 ± 2.8
Choline	36.6 ± 8.1	33.9 ± 6.2	60.8 ± 8.8	36.4 ± 12.0
Creatine	175.9 ± 18.3	171.1 ± 14.3	218.4 ± 6.4	161.8 ± 54.4
Acetate	13.9 ± 2.6	17.1 ± 7.0	76.7 ± 11.8*	73.5 ± 49.4*
Succinate	12.7 ± 1.0	14.7 ± 1.4	21.0 ± 8.9	10.1 ± 2.6
Lactate	209.9 ± 34.3	328.7 ± 29.8*	625.6 ± 55.1*	334.5 ± 85.9
Inositol	121.6 ± 21.6	125.6 ± 19.2	270.7 ± 46.8*	214.2 ± 90.9
Glucose	9.6 ± 2.0	4.0 ± 1.6	40.8 ± 18.5*	7.7 ± 3.8

<sup>a</sup> Values are given as nmol metabolite/mg protein ± sem.

\* Significantly different from controls:  $P < 0.05$  (ANOVA + Student-Newman-Keul).

**Tableau 7 :** Concentration en métabolites (en nmol/mg) en fonction du statut histologique (d'après Aasly et al., 1999).

On observe notamment une importante augmentation de GABA et une nette diminution de NAA dans le groupe dysplasie corticale et sclérose tubéreuse. L'ensemble de ces résultats ont conduit à se focaliser sur le cycle glutamate/glutamine car des anomalies de concentrations en glutamate (diminution ou augmentation) ont été le plus souvent observées. Ce résultat ainsi que la diminution de NAA apparaissent comme les plus robustes au travers de l'ensemble des études menées. Enfin la dernière étude a été publiée en 2008 par Vielhaber et al. sur 12 patients atteints d'ELT. La méthodologie a permis la microdissection des sous-régions de l'hippocampe (CA1 et CA3 notamment). Les auteurs rapportent une grande variation de concentration en NAA chez les patients cependant avec une diminution significative dans la région CA3 ainsi qu'une augmentation de lactate, de glucose et de succinate. Dans le même temps les pertes cellulaires semblaient plus importantes dans la sous-région CA1. Les auteurs ont par ailleurs évalué l'activité d'une enzyme mitochondriale marqueur de stress oxydatif (l'aconitase). Ainsi la diminution de concentration en NAA semblait d'avantage corrélée à l'activité de cette enzyme qu'à la perte neuronale. Les auteurs suggèrent deux éléments de conclusions : (i) la diminution de NAA n'est pas homogène dans l'hippocampe et (ii) cette diminution semble en lien avec l'activité des mitochondries.

Bien que ces études aient permis des avancées majeures dans l'exploration métabolique de la maladie épileptique elles souffrent dans l'ensemble de deux limites méthodologiques majeures : un nombre modeste de patients inclus par étude et l'absence de recours à des statistiques multivariées permettant de tester des hypothèses clinico-métaboliques.



## 7. Le modèle lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal

### 7.1 Généralités

Comme nous l'avons indiqué précédemment, il semble que les lésions induites lors d'une agression initiale chez l'homme soient responsables de toute une série de réorganisations compensatrices. Rappelons que l'on estime à près de 90% la proportion de patients souffrant d'ELT pour laquelle une agression initiale a effectivement pu être détectée. Dans une écrasante majorité cet épisode a lieu avant l'âge de 5 ans. Ces observations ont ainsi poussé les chercheurs à faire l'hypothèse que, suite à cet événement précoce, des réorganisations à long terme pourraient être à l'origine du déclenchement de la maladie. La caractérisation de ces réorganisations à long terme est au cœur de la modélisation recherchée chez l'animal. En effet, parmi ces nombreuses réorganisations, certaines pourront être bénéfiques alors que d'autres seront plutôt délétères contribuant ainsi à la mise en place d'une circuiterie hyperexcitable.

Il existe de nombreux modèles animaux d'ELT. Chacun de ces modèles possède une approche spécifique selon la façon d'induire l'événement initial. Si l'on considère la maladie épileptique au sens large, quatre grands types de modèles peuvent ainsi être définis. Tout d'abord le modèle neurochimique qui fait appel à l'injection d'un agent chimique provoquant ainsi une excitotoxicité à l'origine d'un état de mal (exemples : le modèle à l'acide kaïnique, au pentylènetétrazole (PTZ), à la pilocarpine associé ou non au lithium). Un second type de modèle fait appel à la stimulation intracérébrale à l'aide d'électrodes placées à demeure chez l'animal. Selon une tension et une fréquence définies, un courant est délivré de façon répétée à une ou plusieurs structures cibles de l'encéphale induisant ainsi le recrutement progressif de certains circuits cérébraux appelé aussi embrasement (ou *kindling*) sans introduire de lésions structurales majeurs (Tuunanen et al. 2000 ; Brandt et al., 2004). Ces circuits devenus hyperexcitables sont à l'origine du déclenchement de crises épileptiques. Une autre catégorie fait appel à des interventions physiques ou mécaniques : élévation de la température de l'environnement pendant une période prolongée, lampes à infrarouge, four à micro-ondes, électrochocs, traumatisme crânien... Enfin, il existe de nombreuses souches de souris issues du génie génétique présentant un intérêt dans la modélisation de la maladie épileptique. Ainsi le choix d'un modèle reste dépendant du type de syndrome épileptique que l'on cherche à étudier.

Pour ce qui est de l'ELT humaine, le choix du modèle est d'autant plus important qu'il doit à la fois répondre au décours temporel et aux caractéristiques cliniques, lésionnelles,

électroencéphalographiques et pharmacologiques de la maladie. Il doit donc comporter une phase aiguë, équivalente à l'agression initiale chez l'homme et qui initie les lésions et l'épileptogénèse. Il doit également comporter une phase latente, libre de crises pendant laquelle les réorganisations prennent place. Enfin, pendant la phase chronique, les animaux doivent tous développer des crises récurrentes similaires aux crises partielles complexes de l'ELT humaine, de façon durable.

## 7.2 Description du modèle

Il y a beaucoup de modèles animaux pour la recherche sur l'épilepsie (Löscher, 1997). Tous les modèles ne répondent pas simultanément à l'ensemble de ces critères : par exemple, dans le modèle d'embrasement, les crises ne sont pas spontanées et les lésions sont minimales ; dans le modèle à l'acide kaïnique tous les animaux ne deviennent pas épileptiques. En revanche le modèle d'ELT induite par le lithium et la pilocarpine a l'avantage de présenter en plus des lésions, des réorganisations, une phase latente et chronique ainsi que des crises récurrentes spontanées dont les caractéristiques sémiologiques sont très proches de l'ELT humaine et ce chez tous les animaux adultes de façon durable.

La pilocarpine est un agoniste cholinergique actif sur les récepteurs muscariniques de type M1 et M2. Elle possède les propriétés communes aux agonistes cholinergiques, en particulier un effet exciteur provoquant une augmentation de la fréquence de décharge neuronale et l'apparition de crises épileptiques. Le modèle pilocarpine a été décrit à l'origine par Turski et al. (1983). Le modèle associant le lithium et la pilocarpine fut créé par Honchar et al. (1983) et détaillé par Persinger et al. (1988, 1993). Comparativement au modèle pilocarpine pour lequel des doses élevées de pilocarpine (350-400 mg/kg) sont nécessaires pour l'induction de l'état de mal, le modèle lithium-pilocarpine nécessite 10 à 15 fois moins de convulsivant, le lithium ayant la propriété de potentialiser les effets de la pilocarpine.

*Rôle de la pilocarpine.* La cascade des mécanismes moléculaires induits par la pilocarpine n'est pas totalement élucidée ; cependant le schéma global fait l'hypothèse que l'activation du système cholinergique initierait et maintiendrait une activité soutenue de crises qui provoquerait dans un second temps l'activation de mécanismes excitateurs impliquant les voies du glutamate et/ou de l'aspartate qui seraient à leur tour responsables des dommages cellulaires induits au cours de l'état de mal (Lee et al., 1997). L'hypothèse actuellement retenue propose que l'excitation cholinergique muscarinique provoque l'entrée d'ions calcium et sodium induisant ainsi des dépolarisations

membranaires prolongées aboutissant à des activités épileptiformes (Turski et al., 1989). Ces dépolarisations postsynaptiques croissantes engendreraient la mise en place de mécanismes excitotoxiques. En effet, celles-ci seraient suffisantes pour lever le blocage voltage-dépendant du magnésium sur le récepteur NMDA. L'activation de ces récepteurs NMDA va alors entraîner une entrée massive d'ions calcium au niveau intracellulaire. Les concentrations en ions calcium et sodium constituent des éléments critiques du déterminisme de la mort cellulaire. Ainsi, dès lors que cette entrée massive déborde les capacités cellulaires des systèmes tampons de régulation de l'homéostasie ionique, la mort neuronale est inéluctable. En effet, ces modifications ioniques intracellulaires s'accompagnent de nombreuses cascades délétères : modification du pH cytosolique, lésions mitochondriales, formation de radicaux libres, activation de kinases, de protéases... Monaghan et Cotman (1985) ont montré un parallèle étroit entre les régions présentant une forte densité de récepteurs glutamatergiques et celles présentant des dommages neuronaux. Les résultats rapportés par Fujikawa et al. (1999) semblent confirmer la mise en jeu de mécanismes de mort neuronale par nécrose dans le modèle lithium-pilocarpine. Par ailleurs, des mesures de concentrations du glutamate extracellulaire par microdialyse, réalisées au niveau de l'hippocampe chez des patients atteints d'ELT ont montré une augmentation soutenue de glutamate extracellulaire avant et pendant les crises. Ces augmentations peuvent atteindre des concentrations potentiellement neurotoxiques (During et Spencer, 1993).

*Rôle du chlorure de lithium.* Une augmentation de l'activité cholinergique après un traitement au lithium chez le rat a été mise en évidence à de nombreuses reprises par des études montrant un abaissement du seuil épileptogène pour de nombreux agonistes cholinergiques comme l'arécoline, la physostigmine ou encore le diisopropylfluorophosphate. L'hypothèse actuelle est que le lithium entraîne une augmentation à la fois de l'expression et de la sensibilité des récepteurs muscariniques (Marinho et al., 1998 ; Müller et al., 2009) Toutefois ce mécanisme de potentialisation n'est pas totalement clarifié. Il découlerait en fait des propriétés pharmacologiques du chlorure de lithium étudiées par ailleurs. Nous mentionnerons ici les mécanismes pharmacologiques pouvant rendre compte de cette potentialisation.

- (1) L'un des premiers mécanismes d'action du chlorure de lithium est son influence sur le métabolisme des phosphoinositides. Les composés de la voie des phosphoinositides, qui constituent des seconds messagers, sont bien identifiés. Les deux principaux sont : i) l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) ; ii) le 1,2-diacylglycérol. Le chlorure de lithium intervient dans de multiples voies métaboliques du recyclage de l' $IP_3$ . La concentration en inositol-1-phosphate ( $IP_1$ ), un produit du métabolisme du phosphatidyl-inositol, est augmentée dans le cerveau du rat après traitement par le lithium. Cette augmentation est due en partie à

l'inhibition par le lithium de l'enzyme myo-inositol-1-phosphate, qui hydrolyse le myo-inositol-1-phosphate en myoinositol (Honchar et al., 1983).

- (2) Un autre mécanisme d'action du chlorure de lithium est la régulation de facteurs de transcription (CRE, AP1) (Ozaki et Chuang, 1997) et de gènes précoces comme c-fos et c-jun (Williams et Jope, 1994).
- (3) Le lithium augmenterait l'excitabilité axonale présynaptique par un mécanisme calcium-dépendant (Valentin et al., 1997). Le lithium pourrait également potentialiser les effets de la pilocarpine en modulant la fonction des catécholamines (Marhino et al., 1998).
- (4) Le lithium peut également inhiber l'activité de la glycogène synthétase kinase 3 $\beta$ . Cette protéine est une sérine/thréonine kinase, impliquée dans la détermination du devenir cellulaire durant le développement ainsi que dans des activités favorisant les signaux de l'apoptose (Bijür et al., 2000). Le lithium interviendrait également dans l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt-1 et supprimerait l'effet inhibiteur de cette protéine induite par le glutamate dans des cultures de neurones, ce qui diminuerait la mort cellulaire par apoptose (Chalecka-Franaszek et Cuang, 1999). Par conséquent l'action inhibitrice du lithium sur ces deux enzymes aurait une action protectrice.

Enfin, de façon plus récente des propriétés neuroprotectrices du lithium ont pu être mises en évidence *in vitro* contre de nombreux stimuli pro-apoptotiques et neurotoxiques tels que la privation de potassium (Mora et al., 2002), le glutamate (Hashimoto et al., 2003) ou encore le peptide  $\beta$ -amyloïde (Alvarez et al., 1999). Bien que la majorité de ces résultats a été observée après un traitement chronique, l'administration aiguë de chlorure de lithium reste encore insuffisamment étudiée. Un travail récent mené par Jorda et al. (2005) a montré des effets neuroprotecteurs *in vitro* sur des cultures primaires de neurones, traitées par de la colchicine, 24 h après l'application de lithium.

### 7.3 Décours temporel

#### 7.3.1 L'état de mal (EdM)

Quelques minutes après l'injection de pilocarpine (25-30 mg/kg), les animaux adultes préalablement traités par le chlorure de lithium (3mEq/kg 20h plus tôt) s'immobilisent et présentent les premiers signes cholinergiques périphériques : dilatation des pupilles, mâchonnements, hochements de tête, salivation. Les premiers signes électrographiques surviennent après 20 minutes et sont essentiellement composés d'activités rapides de basse amplitude dans l'hippocampe, se propageant rapidement au cortex. Puis les animaux présentent une hyperactivité motrice et les crises deviennent plus sévères, représentées par des activités rapides de grande amplitude avec apparition de clonies de la face, des membres antérieurs, puis des redressements et des chutes. La durée de l'état de mal peut varier entre 6 et 12 heures. Après 10 h d'état de mal, l'activité électrographique diminue en fréquence et en amplitude aboutissant à une activité de base très faible, ponctuée par des décharges post-épileptiformes rythmiques (Turski et al., 1983). Au cours de la deuxième heure d'état de mal, on observe des augmentations métaboliques généralisées de 300 à 550%. La distribution cérébrale de ces augmentations métaboliques est par ailleurs corrélée aux régions lésées (Dubé et al., 2001 ; Fernandes et al., 1999). Sans intervention, l'état de mal conduit souvent à la mort de l'animal.

#### 7.3.2 La phase de latence

La période de latence est la période au cours de laquelle se constitue véritablement l'épileptogénèse. La phase de latence peut durer de 4 à 44 jours selon les rats (Dubé et al., 2001 ; Cavalheiro et al., 1995). Elle est également dépendante de la durée de l'état de mal : plus l'état de mal épileptique a été long, plus la phase latente est courte (Lemos et Cavalheiro, 1995). Pendant cette période, les rats ne présentent aucune manifestation clinique de crises. A l'EEG on observe un rythme perturbé, ponctué de pointes isolées ou généralisées sans traduction clinique. Au niveau métabolique, l'utilisation de glucose diminue significativement dans la plupart des régions du cerveau antérieur, excepté au niveau du noyau caudé (Dubé et al., 2001). Ces diminutions reflètent les pertes cellulaires observées dans les aires corticales, limbiques et thalamiques. Deux structures

connectées aux ganglions de la base montrent des augmentations significatives : la substance noire et le colliculus supérieur. Ces augmentations pourraient illustrer les tentatives de compensation afin d'activer un système de contrôle des crises pour tenter de réduire l'hyperexcitabilité cellulaire.

### 7.3.3 La phase chronique

Les premières crises sont caractérisées par des automatismes faciaux de type mâchonnements, clignements des yeux, hochements de tête parfois difficiles à observer chez les animaux. Rapidement la sévérité des crises spontanées augmente, celles-ci s'accompagnent de clonies de la face, des membres antérieurs pouvant aller jusqu'au redressement et à la chute (cette sévérité est corrélée à l'échelle de Racine ; Racine, 1972). Cette évolution de l'intensité des crises au cours de la phase chronique suggère que le circuit évolue encore au cours de cette phase. La durée des crises varie de 30 s à 1 min selon une fréquence de 2 à 5 par semaine et ce jusqu'à la mort de l'animal. L'EEG semble normal au cours des phases intercritiques avec une apparition inconstante d'anomalies de type pointes. Les crises débutent par l'apparition d'une activité très rapide d'amplitude faible, puis celle-ci augmente au fur et à mesure de la propagation de la crise à l'ensemble du cortex. Aucun profil EEG spécifique ne permet d'identifier le passage d'une phase intercritique à une phase critique avant la manifestation clinique de la crise. L'EEG postcritique est déprimé et ponctué par des pointes pendant quelques secondes à quelques minutes. Les taux d'utilisation du glucose sont très proches de ceux observés au cours de la phase latente avec une diminution généralisée. Seul le hile du gyrus denté ainsi que le cortex piriforme conservent un hypermétabolisme relatif par rapport au faible pourcentage de neurones survivants. Ces résultats déjà observés au cours de la phase latente indiquent une activité hypermétabolique marquée des cellules survivantes (Dubé et al., 2001).

## 7.4. Conséquences neuropathologiques

### 7.4.1 Pertes cellulaires

L'hippocampe est une région très vulnérable à l'état de mal (Fujikawa, 1996 ; Turski et al., 1983). Les dommages cellulaires s'établissent très tôt après l'état de mal, avant 24 h. La région CA1 et le hile du gyrus denté sont les deux régions les plus atteintes et une perte cellulaire supérieure à 50% dans ces deux régions constitue un élément du diagnostic de sclérose de l'hippocampe. Au niveau de CA1 les cellules principales du stratum pyramidale et les interneurons du stratum oriens sont les plus touchés (Peredery et al., 2000). Au niveau du gyrus denté, les interneurons contenant des récepteurs à la somatostatine sont principalement touchés alors que les interneurons positifs pour la calbindine semblent préservés (Dubé et al., 2000a). La perte de ces interneurons contrôlant les activités entrant dans l'hippocampe contribue sans doute aux activités électriques anormales observées dans la formation hippocampique après l'état de mal. Environ 40 minutes après le début de l'état de mal des souffrances neuronales irréversibles s'étendent à de nombreuses autres régions telles que le cortex entorhinal et piriforme. Dans les 24 heures, ces dommages s'étendent dans une moindre mesure à l'amygdale, au thalamus et au néocortex (Roch et al., 2002a, et 2002b) .

### 7.4.2 Les réorganisations

Les réorganisations débutent immédiatement après l'état de mal épileptique et se poursuivent pendant la période latente et l'apparition de crises récurrentes spontanées. Elles ont principalement été étudiées au niveau de la formation hippocampique, elles comprennent différents événements : réorganisation des axones, des dendrites, modification de la neurotransmission, modification de l'expression de certains récepteurs. Il ne s'agit pas ici de faire une liste exhaustive des modifications étudiées dans la littérature, néanmoins il semble indispensable d'aborder les modifications les plus significatives et les plus couramment décrites.

(1) Bourgeoisement et réorganisation des axones et des dendrites

Les fibres moussues, ou axones des cellules granulaires, se projettent normalement dans le hile et sur les cellules de la région CA3 de l'hippocampe. Après l'état de mal, les axones des cellules granulaires du gyrus denté se réorganisent dans la couche infrapyramidale de CA3. Ces fibres moussues se dirigent également dans la couche moléculaire du gyrus denté et innervent les dendrites des cellules granulaires de cette région formant ainsi un circuit récurrent excitateur. Ce bourgeoisement des fibres moussues a également été observé chez l'homme (Mello et al., 1993). On observe également une néosynaptogénèse au niveau des axones des interneurons gabaergiques et peptidergiques de la couche moléculaire du gyrus denté ; ce phénomène a également été observé chez des patients (Mathern et al., 1999). La formation de nouvelles synapses inhibitrices pourrait avoir un rôle compensatoire par rapport au bourgeoisement des fibres moussues, cette compensation peut toutefois être délétère dans la mesure où elle contribuerait à une synchronisation à l'origine des activités épileptiques (Avoli et al., 1996).

(2) Une neurogénèse

La neurogénèse est augmentée dans l'hippocampe épileptique alors que chez l'animal adulte témoin, celle-ci existe mais elle est peu importante (Parent et al., 1997 ; Kornac et Rakic, 1999). Les précurseurs neuronaux se trouvent dans la couche sous-granulaire du gyrus denté où ils prolifèrent de façon continue et migrent dans la couche des cellules granulaires où ils développent la morphologie de cellules granulaires. Ces observations suggèrent que la plasticité pathologique observée dans l'hippocampe au cours de l'épileptogénèse pourrait résulter de connexions aberrantes formées par des cellules granulaires néoformées (Parent, 2002 ; Parent et al., 1997). Par ailleurs, dans le modèle lithium-pilocarpine une augmentation des cellules calbindine-positives au niveau du hile a été observée (André et al., 2001), ce qui a déjà été rapporté chez l'homme (Magloczky et al., 2000).

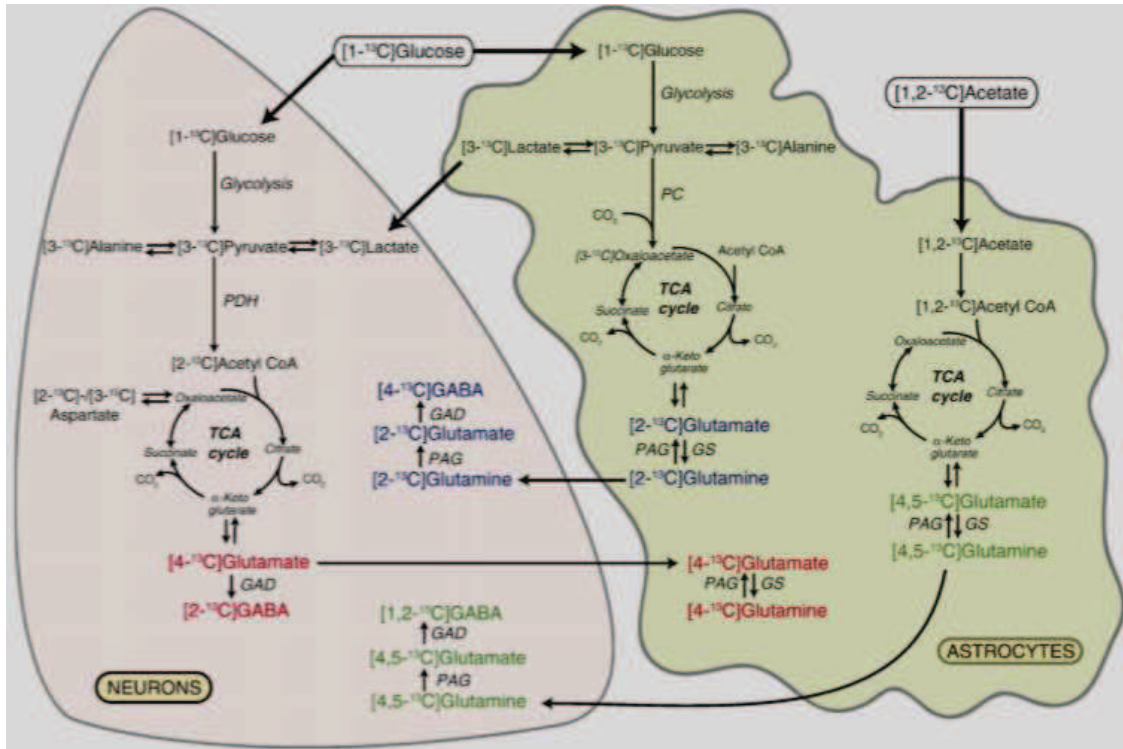
(3) Une gliose réactionnelle

La gliose réactionnelle est le résultat d'une activation et d'une transformation des cellules gliales en réponse aux nécroses neuronales ; elle touche la microglie et par la suite, les astrocytes. Les cellules gliales assurent un rôle de surveillance du tissu nerveux en maintenant constant l'environnement ionique extracellulaire et en assurant l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral au sein de la barrière hémato-encéphalique. La gliose réactionnelle permet de créer une barrière entre les zones lésées et non lésées, en apportant les nutriments nécessaires aux neurones survivants et en phagocytant les débris cellulaires causés par les lésions (Van der Hel et al., 2013 ; Lively et al., 2007).



## 7.5 Caractérisation métabolique et enjeu de notre travail

Note équipe a largement contribué à la caractérisation métabolique du modèle et ce à toutes les phases de son déroulement temporel notamment à l'aide de la technique d'autoradiographie quantitative au [1-<sup>14</sup>C]-2-désoxyglucose (Pereira de Vasconcelos et al., 2002 ; Dubé et al., 2001, 2000a, 2000b ; Leroy et al., 2003) et de l'IRM (Roch et al. 2002a et 2002b). Ces données ont le plus souvent été corrélées à la perte cellulaire induite. Plus récemment le métabolisme neuronal et astrocytaire a fait l'objet d'études spécifiques en spectroscopie RMN à l'aide de substrats marqués au carbone 13 (Melo et al., 2005). Après deux mois de crises récurrentes spontanées deux substrats marqués ont été administrés aux animaux le [1-<sup>13</sup>C]glucose, substrat énergétique préférentiel des neurones et également métabolisé par les astrocytes et le [1,2-<sup>13</sup>C]acétate substrat énergétique des astrocytes uniquement. Le schéma ci-dessous (figure 20) illustre l'intégration de ces deux substrats et de leurs métabolites engendrés. Ces métabolites sont qualifiés d'isotopomères dans la mesure où la localisation de l'atome de carbone 13 est variable en fonction du substrat considéré issu d'un cycle métabolique neuronal ou glial. Les résultats de cette étude indiquent que les concentrations en glutamate, aspartate, NAA, ATP et glutathion sont diminuées dans l'hippocampe des rats lithium-pilocarpine. Les concentrations en métabolites issus du [1,2-<sup>13</sup>C]acétate ne semblaient pas différentes de celles des rats contrôles. La concentration en glutamine issue du glucose marqué était diminuée dans le néocortex et le cervelet mais normale dans l'hippocampe. Les auteurs suggèrent une absence de modifications de l'unité glio-neuronale au sein de l'hippocampe mais une anomalie du cycle glutamate/glutamine dans les régions corticales. Les auteurs concluent en l'absence d'anomalie dans les cellules astrocytaires. Ce résultat pourrait apparaître contre-intuitif au vu des éléments disponibles dans la littérature. Le but de notre travail est ainsi de réaliser un travail parallèle à l'aide de la technique RMN HRMAS (sans étape d'extraction) chez des rats ayant subi une plus longue période de crises récurrentes spontanées. Le rationnel est que les anomalies métaboliques astrocytaires auraient une dynamique plus lente dépendant de la durée de la maladie. Par ailleurs d'un point de vue méthodologique, l'enjeu est de pouvoir produire des spectres de carbone 13 de haute résolution en condition MAS. A notre connaissance ce type de travaux n'a été réalisé que par une seule équipe à l'heure actuelle (Risa et al., 2008). Enfin les données feront également l'objet d'une analyse multivariée, étape non réalisée dans la publication de Melo et al. (2005).



**Figure 20.** Schéma simplifié des possibles isotopomères issus du métabolisme de l'unité glio-neuronale engendrés par l'administration de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate après un premier tour du cycle des acides tricarboxyliques. Via la glycolyse le  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose est converti en  $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate qui peut ensuite être transformé en  $[3-^{13}\text{C}]$ lactate or  $[3-^{13}\text{C}]$ alanine or  $[2-^{13}\text{C}]$ acétyl- CoA. Il s'ensuit la formation de  $[4-^{13}\text{C}]$ glutamate et de  $[2-^{13}\text{C}]$ GABA dans les neurones. D'après Haberg et Qu (2000), 66% du  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose est métabolisé par le neurone. Dans l'astrocyte la pyruvate carboxylase transforme le  $[3-^{13}\text{C}]$ pyruvate en  $[2-^{13}\text{C}]$ glutamate ou en  $[2-^{13}\text{C}]$ glutamine. Si ce métabolite est transporté vers les neurones il est convertit en  $[2-^{13}\text{C}]$ glutamate ou  $[4-^{13}\text{C}]$ GABA. Le  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate est transformé en  $[4,5-^{13}\text{C}]$ glutamate ou  $[4,5-^{13}\text{C}]$ glutamine. Si ce dernier est transporté vers le neurone il est transformé en  $[4,5-^{13}\text{C}]$ glutamate puis en  $[1,2-^{13}\text{C}]$ GABA. Abréviations : GAD : glutamic acid decarboxylase ; GS : glutamine synthétase ; PAG : phosphate-activated glutaminase ; PC : pyruvate carboxylase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; TCA : tricarboxylic acid. D'après Melo et al. (2005).

## **Section expérimentale**

## **EXPERIENCE 1 :**

**Evaluation des méthodes de fixation du tissu cérébral par microondes pulsées sur le métabolome cérébral du rat et leur impact sur les signaux RMN <sup>1</sup>H HRMAS**  
*(publication en annexe 1)*

# 1. Expérience 1 : Evaluation des méthodes de fixation du tissu cérébral par microondes pulsées sur le métabolome cérébral du rat et leur impact sur les signaux RMN HRMAS (<sup>1</sup>H)

## 1.1 Objectifs

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les effets des méthodes de prélèvement, de fixation et de conservation des échantillons biologiques cérébraux analysées par RMN HRMAS. Nous avons simulé chez l'animal les conditions de prélèvements opératoires des tissus ayant cours lors de la neurochirurgie de l'épilepsie : prélèvement, fixation et congélation dans l'azote liquide. Cette méthode a pour conséquence un délai d'ischémie et d'inactivation pouvant modifier le métabolome cérébral des pièces opératoires étudiées. Cette méthode a été comparée à une méthode éprouvée de fixation immédiate *in vivo* des métabolites : le recours à un dispositif de microondes pulsées haute énergie.

## 1.2 Matériels et méthodes

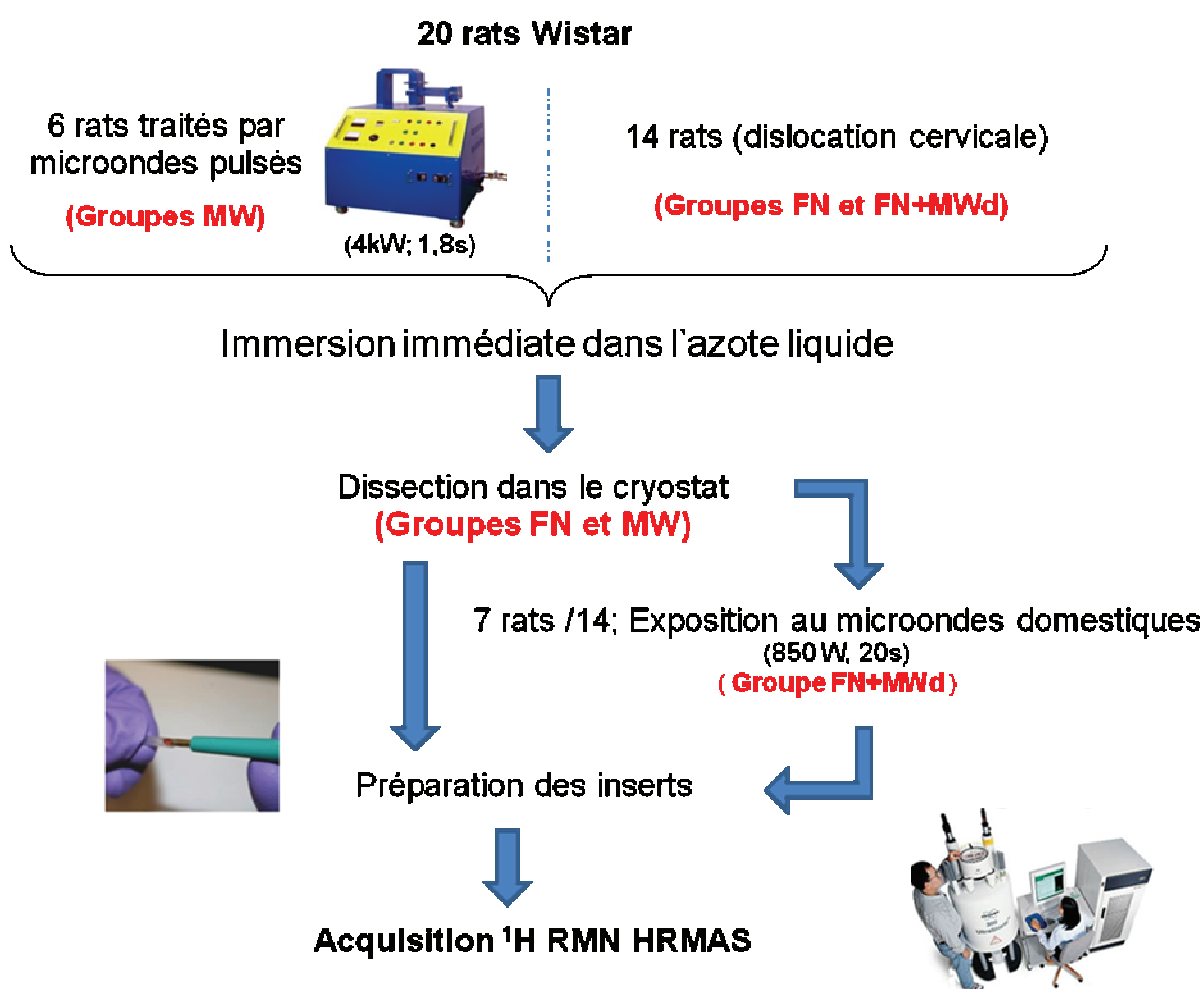
### 1.2.1 Animaux

Vingt rats adultes Wistar (250-300 g) ont été inclus dans l'étude. Les animaux ont été maintenus à la température ambiante sous un cycle de lumière/obscurité normal (12h-12h ; lumière à 7h00). L'eau et la nourriture leur étaient fournis *ad libidum*. Toutes les expériences ont été effectuées conformément aux règles des directives européennes 86/609/CEE et 2010/63/UE, de l'ordonnance du 5 janvier 2012 (ordonnance n°2012-10) et le ministère français de l'agriculture (licence N° 67/97).

### 1.2.2 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques

Six rats ont été soumis à une exposition par microondes pulsées à l'aide d'un dispositif dédié (4 kW, 2,45GHz, 1,8s ; Püschner GmbH, Schwanewede, Allemagne). Il s'agit du groupe MW. Quatorze rats ont subi une dislocation cervicale instantanée immédiatement suivie d'une décapitation et de la chute de la tête dans l'azote liquide. Nous n'avons eu recours à aucune procédure chirurgicale ni aucun anesthésiant. Une fois la tête congelée celle-ci était placée dans un cryostat. Les régions d'intérêt étaient rendues accessibles et prélevées à l'aide d'une curette. La biopsie de la zone

cérébrale d'intérêt est ensuite placée dans un insert (préalablement pesé à vide) de 30 µl de type Kelf. Pour sept des quatorze rats ayant subi une dislocation cervicale, immédiatement après la dissection dans le cryostat, les zones d'intérêt étaient placées dans un microonde domestique pendant vingt secondes (850W, Whirlpool, Benton Harbour, Etats-Unis). La masse de tissu biologique est comprise entre 10 et 20 mg. 10 µl de D<sub>2</sub>O sont ensuite ajoutés pour fournir un signal d'asservissement au spectromètre. L'ensemble est ensuite placé à -80°C. Pour chaque rat deux biopsies cérébrales issues du cortex frontal étaient prélevées. Le jour des acquisitions RMN, l'insert est placé dans un rotor en zirconium (ZrO<sub>2</sub>) et scellé par un bouchon hermétique avec ailettes. La figure 21 ci-dessous résume le schéma expérimental :



**Figure 21.** Schéma expérimental pour l'étude comparative des méthodes de fixation. Sans exposition aux microondes groupe par simple immersion dans l'azote liquide : groupe FN ; Exposition in vivo aux microondes pulsées haute énergie : groupe MW ; Immersion dans l'azote liquide et exposition aux microondes domestiques : groupe FN+MWd.

### 1.2.3 Acquisition des spectres $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS

Toutes les acquisitions unidimensionnelles des spectres protons ont été réalisées selon le protocole suivant. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III 500 opérant à une fréquence de 500,13 MHz. Le spectromètre dispose d'une sonde double résonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) de 4 mm équipée de gradients. Une unité de refroidissement permet le maintien de l'échantillon à 4°C. La rotation de l'échantillon a été fixée à 3502 Hz afin de s'assurer de la déportation d'éventuelles bandes de rotations dans les régions d'intérêts. Une séquence impulsionnelle de type CPMG a été utilisée. Le délai entre les impulsions à 180° a été synchronisé avec la rotation de l'échantillon soit 285 $\mu\text{s}$  (1/3502) afin de diminuer au maximum les pertes de signal imputable à des inhomogénéités du champ  $B_1$  (Elbayed et al., 2005 ; Piotto et al., 2001). La largeur de bande était de 14 ppm, la résolution par points de 32k, le délai de relaxation était de 2s pour un temps d'acquisition de 2,3s. Au total 128 FID ont été acquis pour chaque échantillon soit une durée d'acquisition de 10 minutes. Le signal résiduel de l'eau était présaturé pendant les 2s de relaxation. Avant l'application de la transformée de Fourier un filtre de 0,3 Hz était appliqué. La calibration des spectres a été effectuée sur le doublet issu du signal du lactate (1,33 ppm).

**Acquisitions pour l'étude de la stabilité des signaux.** Le même type d'acquisition 1D  $^1\text{H}$  a été effectué toutes les 10 minutes pendant les deux premières heures puis à 4, 6, 8, 12 et 15 heures après le début de la première acquisition. Au total 16 spectres ont été acquis par échantillon soit 96 spectres en tout. Pendant toute cette période, l'échantillon continuait sa rotation à 4°C à la même vitesse (3502 Hz).

### 1.2.4 Traitement des données et analyses statistiques

Les éléments décrits dans ce paragraphe ont été appliqués aux données 1D  $^1\text{H}$  HRMAS obtenues pour les trois expériences. Tous les spectres ont fait l'objet d'un phasage, d'une correction de ligne de base et d'un calibrage en fréquence. Cette calibration a été effectuée sur le lactate (1,33 ppm pour le  $^1\text{H}$  et 20,70 pour le  $^{13}\text{C}$ ; d'après Martinez-Bisbal et al., 2004). Une normalisation a été effectuée basée sur l'intensité totale des spectres.

Concernant les spectres 1D  $^1\text{H}$ , la quantification a été effectuée à l'aide d'une référence externe de lactate. Les spectres ont fait l'objet d'une pondération par rapport à leur masse. Les pics d'intérêts ont fait l'objet d'une intégration automatique à l'aide d'une routine développée sous MATLAB 7.0 (Mathworks, Natik, Etats-Unis). Le calcul des concentrations a tenu compte de la fonction chimique observée et donc une correction sur le nombre de protons a été appliquée. Les

résultats sont exprimés en nmol.mg<sup>-1</sup> de tissu. Dans un second temps les concentrations obtenues pour chaque échantillon en fonction des groupes ont fait l'objet d'une analyse statistique. Lorsque les comparaisons étaient réalisées sur deux groupes un test de student était réalisé lorsque n > 10 pour les deux groupes, si tel n'était pas le cas pour l'un des deux groupes un test non-paramétrique de Mann-Whitney était appliqué. Lorsque l'analyse statistique de ces concentrations étaient effectuée sur plus de deux groupes un test de type ANOVA était appliqué suivi des tests post-hoc adaptés. Lorsque les effectifs étaient trop restreints des analyses non-paramétriques ont été réalisées : un test de Friedmann pour l'analyse de variance suivi d'un test post-hoc modifié de Mann-Whitney (U-test).

Pour l'analyse par composante principale (PCA), les spectres acquis ont fait l'objet d'une discrétisation de 0,01 ppm (ou *binning*) entre les régions 4,7 et 0,5 ppm à l'aide du logiciel AMIX 3.8 (Bruker, GmbH, Allemagne). Chaque région est normalisée par rapport à l'intensité totale du spectre. Ce traitement permet la création d'une matrice au sein de laquelle les colonnes correspondent aux signaux mesurés pour chaque déplacement chimique (421 variables X) et les lignes aux différents échantillons. Cette procédure correspond à une analyse sur l'ensemble du spectre acquis. La même procédure a été appliquée après discrétisation des aires sous la courbe des dix-neuf métabolites quantifiées selon la méthode décrite précédemment.

### 1.3 Résultats

#### 1.3.1 Concentrations moyennes en métabolites selon la technique de fixation

Le tableau ci-après (tableau 8) présente les concentrations moyennes pour chaque métabolite au sein de chaque groupe expérimental. On peut constater que sur les 16 métabolites, 11 métabolites ont une concentration significativement différente entre les groupes FN et MWp et entre les groupes FN et FN+MWd. L'identité des métabolites dont les concentrations sont significativement différentes pour ces deux comparaisons est très superposable (alanine (Ala), aspartate (Asp), choline (Cho), GABA, glutamine (Gln), glutamate (Glu), myoinositol (mlns), N-acétylaspartate, phosphocholine (PCho)). On observe toutefois des différences notamment pour la créatine, le lactate et la phosphocréatine ainsi que la valine. En effet le lactate et la phosphocréatine montrent des différences significatives de concentration entre les groupes FN et MWp alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les groupes FN et FN+MWd. Pour les concentrations en créatine et en valine la différence est observée entre les groupes FN et FN+MWd. La comparaison des



concentrations entre les groupes MWp et FN+MWd montre 8 différences significatives sur les 16 métabolites (Ace, créatine (Cr), GABA, Gln, lactate (Lac), PCho, phosphocréatine (PCr), valine (Val)). On peut noter que des différences significatives entre les groupes FN et MWp portent sur des métabolites impliqués dans le métabolisme anaérobie (Lac et PCr notamment).

Métabolite	Concentration en nmol.mg <sup>-1</sup> tissu (± EC)			Valeur de P
	groupe FN (n = 13)	groupe MWp (n = 9)	groupe FN+MWd (n = 8)	MWp vs FN+MWd
Acétate	0.24 ± 0.06	0.39 ± 0.31	0.16 ± 0.01	0.027
Alanine	0.47 ± 0.05	0.80 ± 0.27**	0.68 ± 0.03 <sup>#</sup>	NS
Acide aspartique	1.58 ± 0.53	2.41 ± 0.37**	2.22 ± 0.12 <sup>###</sup>	NS
Choline	0.57 ± 0.18	0.30 ± 0.10**	0.31 ± 0.01 <sup>###</sup>	NS
Créatine	4.16 ± 0.56	3.93 ± 1.01	5.08 ± 0.38 <sup>#</sup>	0.005
GABA	2.63 ± 0.41	3.15 ± 0.63*	3.63 ± 0.07 <sup>###</sup>	0.0036
Glutamine	2.38 ± 0.30	3.31 ± 0.68**	4.57 ± 0.27 <sup>###</sup>	<0.001
Glutamate	7.21 ± 1.16	9.65 ± 1.04**	9.74 ± 0.36 <sup>###</sup>	NS
Glycine	1.89 ± 0.34	1.81 ± 0.94	1.37 ± 0.09	NS
Lactate	4.85 ± 0.48	1.90 ± 0.64**	5.06 ± 0.22	<0.001
myo-inositol	5.21 ± 0.49	4.14 ± 0.54**	4.51 ± 0.17 <sup>#</sup>	NS
NAA	4.77 ± 0.52	5.42 ± 0.62*	5.74 ± 0.27 <sup>###</sup>	NS
Phosphocholine	0.68 ± 0.10	0.93 ± 0.25*	1.14 ± 0.02 <sup>###</sup>	0.009
Phosphocréatine	0.25 ± 0.06	1.18 ± 0.63**	0.15 ± 0.02	<0.001
Taurine	5.02 ± 1.03	4.27 ± 0.66	4.63 ± 0.26	NS
Valine	0.008 ± 0.07	0.094 ± 0.11	0.06 ± 0.01 <sup>###</sup>	<0.001

**Tableau 8.** Comparaison des concentrations moyennes en métabolites obtenus par RMN <sup>1</sup>H HRMAS sur des biopsies cérébrales de rats selon la technique de fixation (en nmol.mg<sup>-1</sup>) : technique classique d'immersion dans l'azote liquide (FN groupe), exposition préalable à des microondes pulsées (MWp groupe), immersion dans l'azote et exposition à des microondes non pulsées (FN+MWd). Les résultats sont des moyennes ± EC. \*, \*\* différence statistique significative entre les groupes FN et MWp à p < 0,05 et p < 0,001 respectivement (test Post-hoc de Fischer). #, ## différence statique significative entre les groupes FN et FN+MWd à p < 0,05 et p < 0,001 respectivement (test Post-hoc de Fischer). La colonne de droite représente la valeur statistique p selon la même méthodologie statistique entre les groupes MWp et FN+MWd.

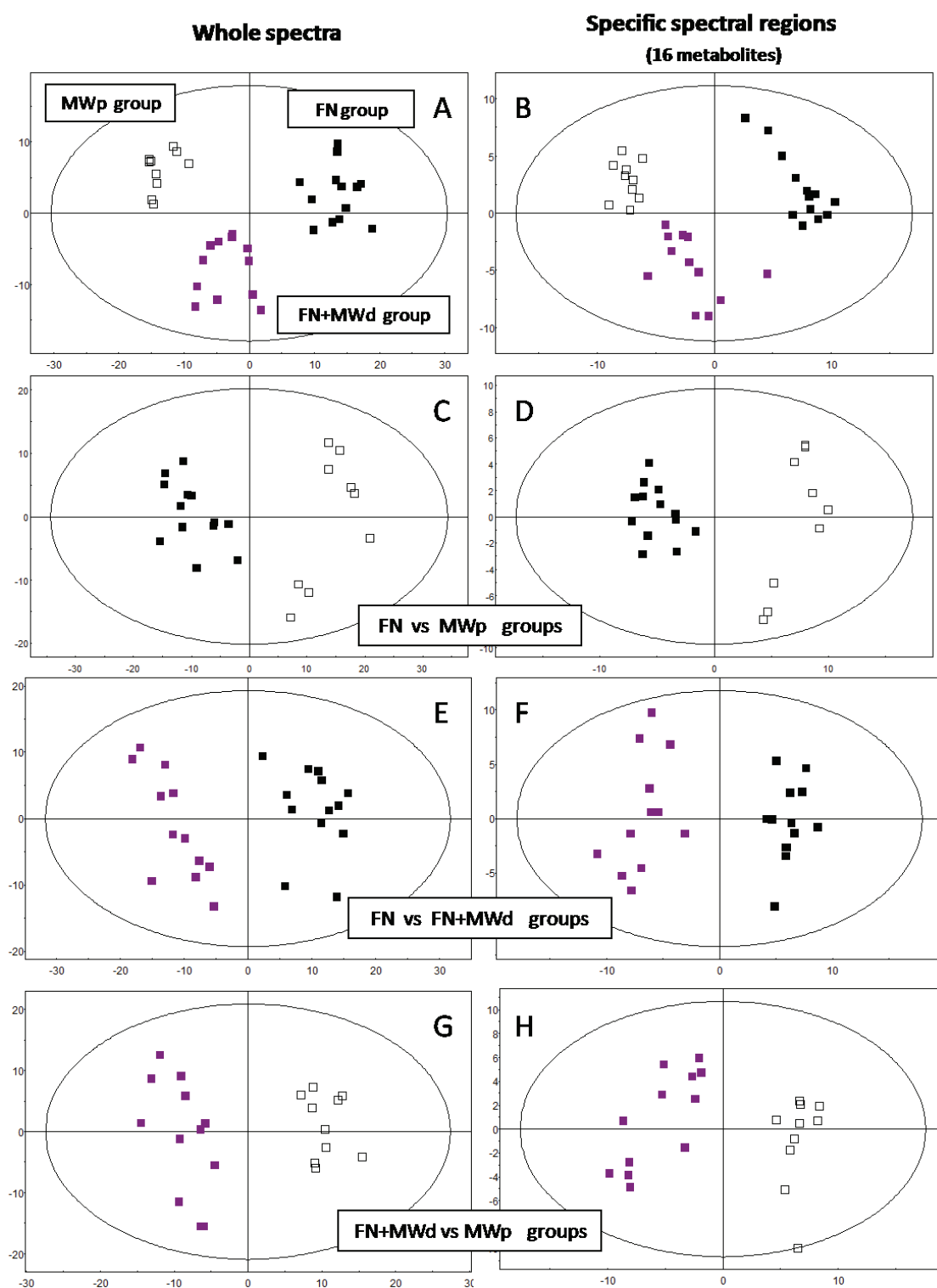
### 1.3.2 Analyse par ACP des différents groupes

Les modèles issus des analyses par ACP sont représentés dans la figure 22. Les résultats statistiques se rapportant à ces modèles sont représentés dans le tableau 9.

Groupes	Spectre entier		16 métabolites	
	R <sup>2</sup> X	Q <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> X	Q <sup>2</sup>
FN, MWp, FN, MWd (fig. 22A et 22B)	0,504	0,427	0,584	0,404
FN vs FN+MWp (fig. 22C et 22D)	0,83	0,80	0,89	0,80
FN vs FN+MWd (fig. 22E et 22F)	0,524	0,375	0,513	0,354
MWp vs FN+MWd (fig. 22G et 22H)	0,440	0,237	0,458	0,217

**Tableau 9.** Résultats statistiques des analyses ACP issus des différents modèles tels que représentés figure 22. Les résultats rapportés tiennent compte des deux premières composantes de chaque modèle.

On observe que seule une distinction statistiquement significative avec une valeur prédictive acceptable apparaît pour les modèles 22C et 22D ( $Q^2 > 0,5$ ). Les valeurs observées pour les autres modèles sont assez satisfaisantes notamment du point de vue de leur valeur  $R^2$  permettant ainsi d'expliquer près de 50% de la variance des données en fonction de la méthode de fixation appliquée.

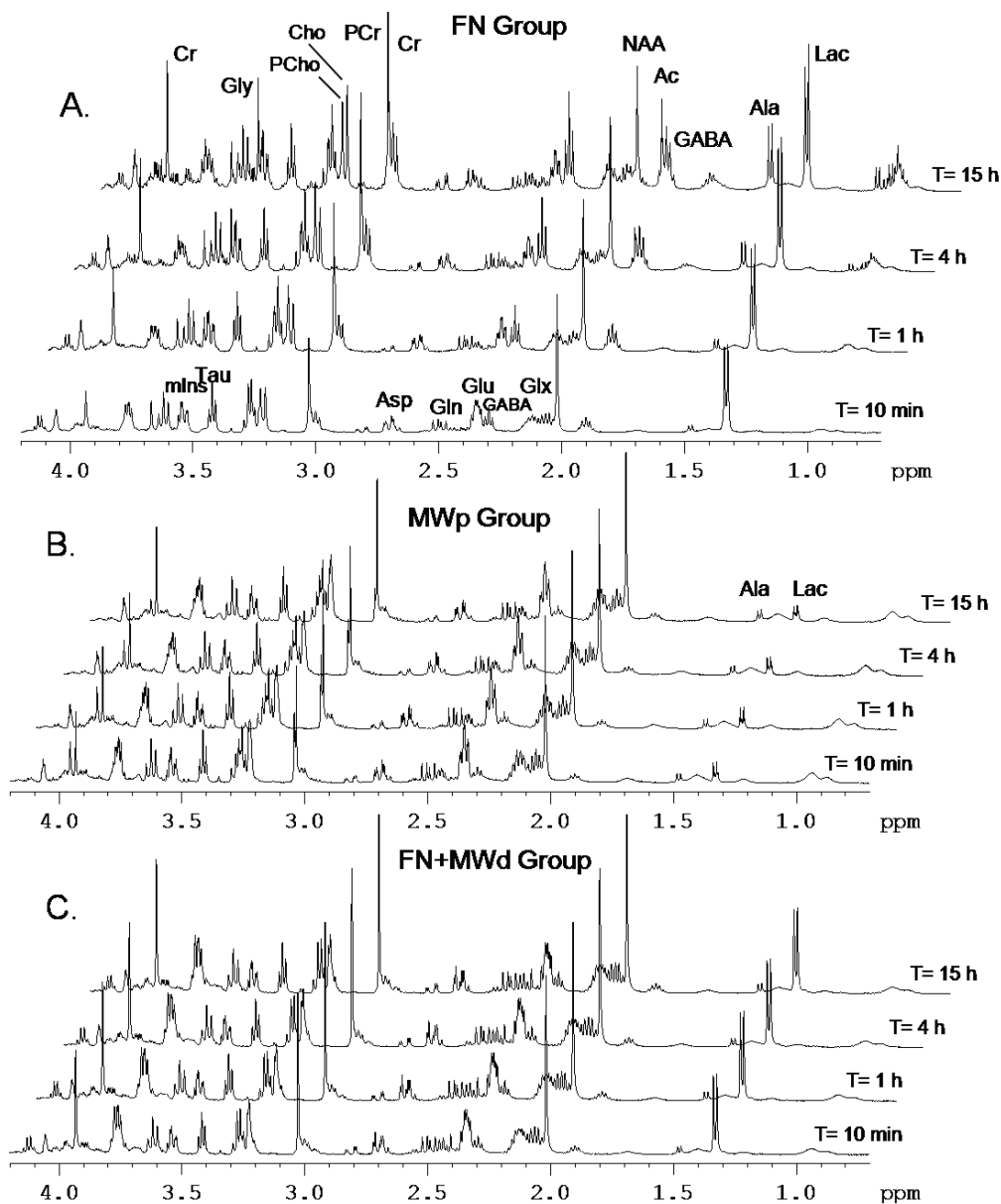


**Figure 22.** Représentation graphique des modèles ACP effectuée à partir des acquisitions RMN  $^1\text{H}$  HRMAS basée sur leurs deux premières composantes. L'ensemble des modèles représentés à gauche de la figure ont été réalisés en tenant compte de l'ensemble des régions spectrales graphiques (A, C, E, G). L'ensemble des modèles représentés à droite de gauche tiennent compte des régions spectrales des 16 métabolites (B, D, F, H cf tableau 8). Chaque modèle intègre 2 ou 3 groupes en fonction de la méthode de fixation : technique classique d'immersion dans l'azote liquide (FN group, carrés pleins), exposition préalable à des microondes pulsées (MWp group, carrés vides), exposition à des microondes non pulsées (FN+MWd group, carrés violets). Figure issue de Detour et al. (2011). Valeurs respectives des  $R^2X$  et  $Q^2$  : 0,504 et 0,427 (22A) ; 0,584 et 0,404 (22B) ; 0,83 et 0,80 (22C) ; 0,89 et 0,80 (22D) ; 0,524 et 0,375 (22E) ; 0,513 et 0,354 (22F) ; 0,440 et 0,237 (22G) ; 0,458 et 0,217 (22H).

### 1.3.3 Etude de la stabilité des signaux RMN <sup>1</sup>H HRMAS sur 15h

La figure 23 montre les variations de signal observées pour un spectre donné au cours du temps en fonction de la méthode de fixation. Le tableau 10 présente les variations de concentrations au cours du temps de chaque métabolite en fonction de la méthode de fixation. On observe que les variations biochimiques *in situ* de concentrations en métabolites durant l'acquisition des signaux RMN est nettement plus stable après fixation *in vivo* par microondes pulsées. Seuls 2 métabolites sur 16 montrent une modification de leurs concentrations au cours du temps. Ce nombre est de 3 après une heure dans le groupe FN et passe à 11 sur 16 après 15h d'acquisition dans ce même groupe. Le groupe FN+MWd montre une évolution maximale de 6 métabolites après 15h.

La figure 24 illustre de façon assez patente les variations de concentrations observées au cours du temps pour différents métabolites. La concentration en lactate semble être fonction de la méthode de fixation. Dans le groupe microondes pulsées, la concentration est très faible, témoignant sans doute d'une initiation quasi nulle du métabolisme cérébral anaérobie alors que la concentration de ce même métabolite (hauteur de pic) dans les autres groupes est nettement plus élevée. Un autre élément important est la stabilité du signal de ce métabolite au cours du temps dans le groupe MWp. Cette concentration croît au cours du temps dans le groupe FN. Elle est stable dans le groupe FN+MWd mais pour une concentration plus élevée. Ce résultat suggère que l'application des microondes pulsées ou non sur le tissu biologique cérébral entraîne une stabilisation des signaux RMN sur des périodes pouvant aller jusqu'à 15h.

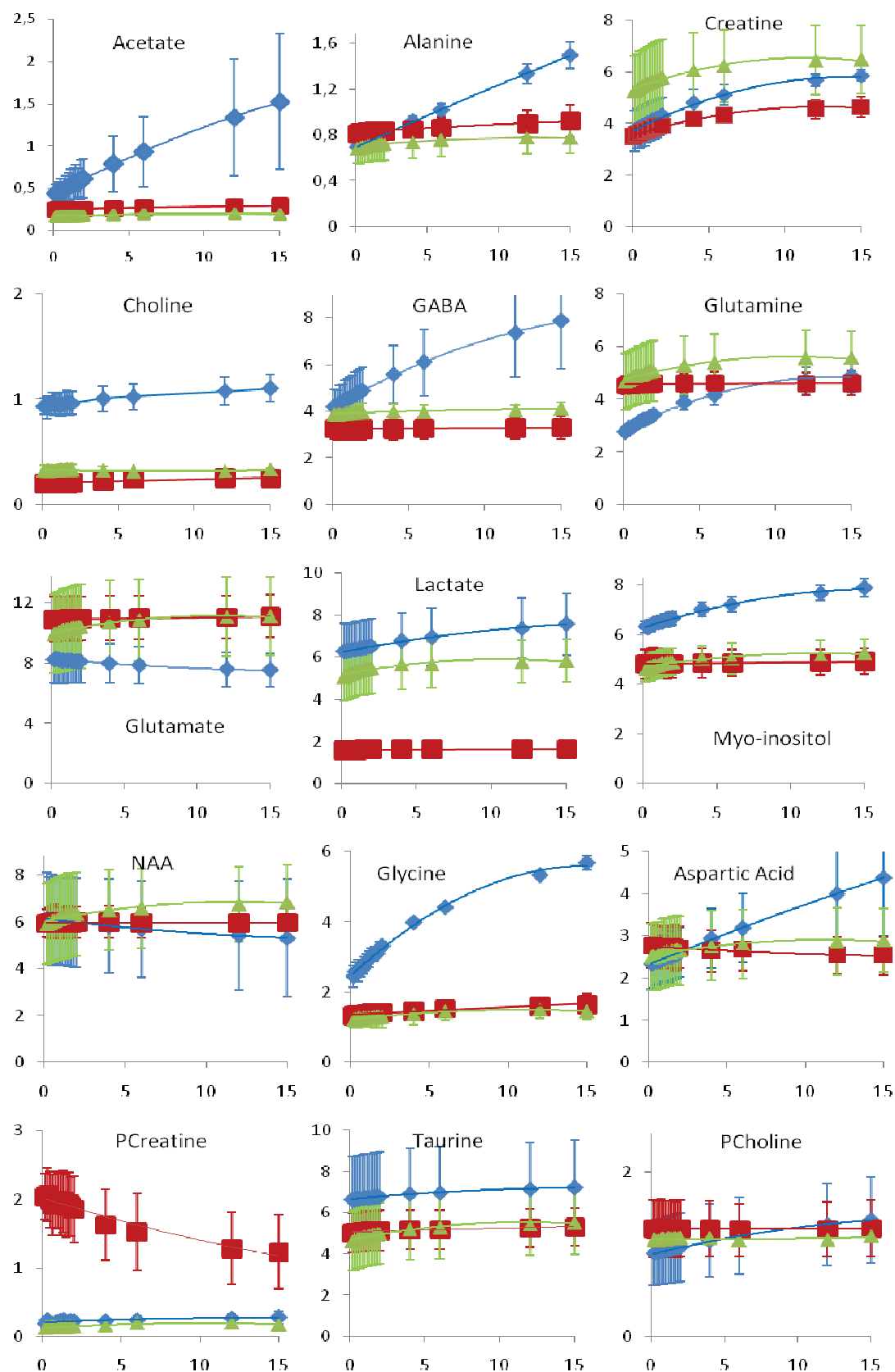


**Figure 23.** Illustration de l'évolution des spectres RMN  $^1\text{H}$  HRMAS acquis au cours du temps d'une biopsie cérébrale de rats en fonction de la méthode de fixation (par immersion dans l'azote liquide (FN group), par microondes pulsées (MWp group) et azote liquide + microondes domestiques (FN+MWd group)). Les spectres ont été acquis après 10 min, 1h, 4h et 15h de rotation continue. Abréviations : Ac, acetate; Ala, alanine; Asp, aspartate; Cho, choline; Cr, créatine; GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Glx: glutamate + glutamine; Gly, glycine; Lac, lactate; mIns, myoinositol; NAA, N-acétyl-aspartate; PCho, phosphocholine; PCr, phosphocréatine; Tau, taurine; Val, valine.

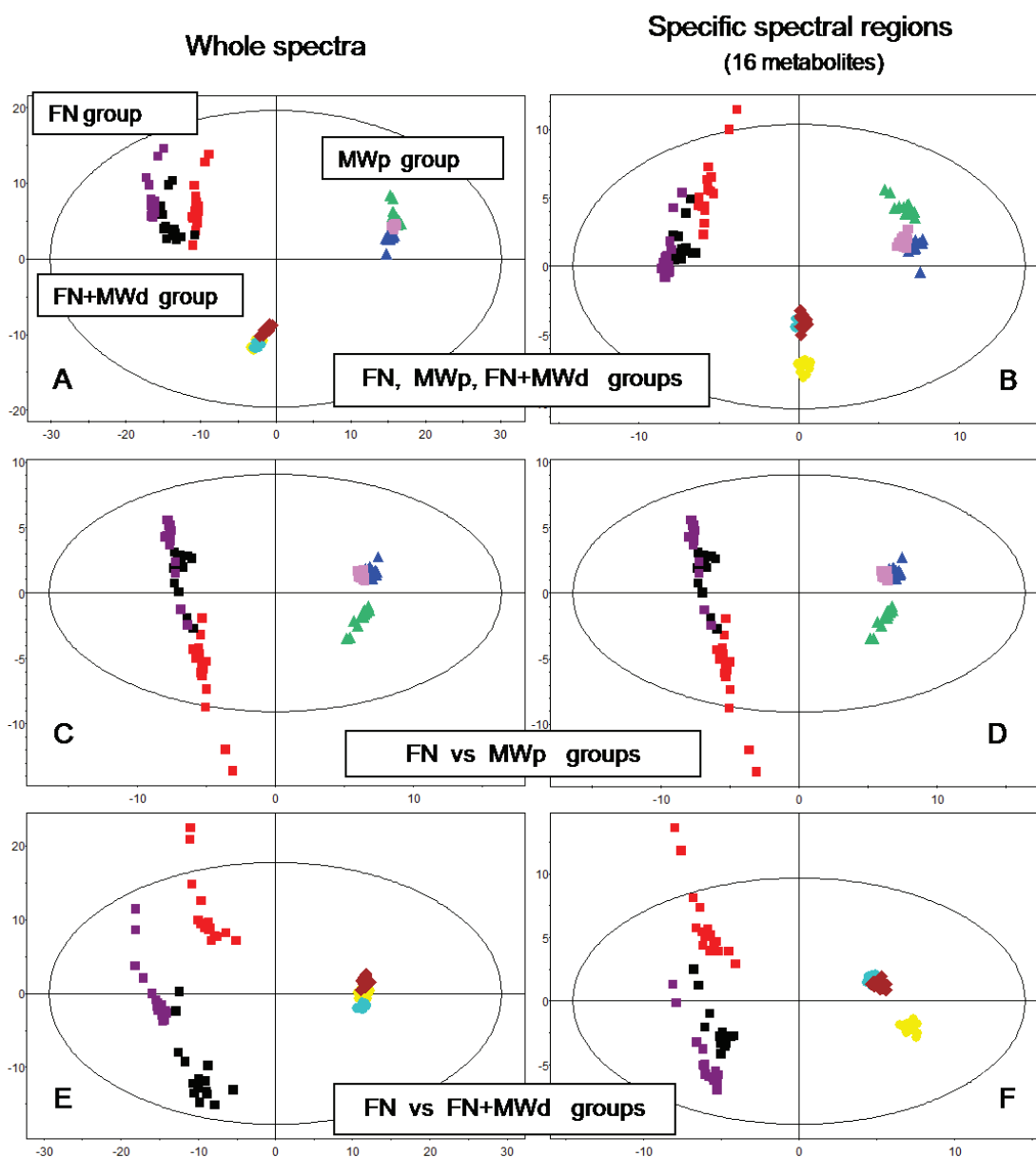
Métabolite	Azote liquide (groupe FN, n = 3)			Microondes pulsées (groupe MWp, n = 3)			Microondes domestiques (groupe FN+MWd, n = 3)		
	10 min vs 1 h	10 min vs 4h	10 min vs 15h	10 min vs 1 h	10 min vs 4h	10 min vs 15h	10 min vs 1 h	10 min vs 4h	10 min vs 15h
Acétate	-	-	<.05+	-	-	-	-	-	-
Alanine	-	<.05+	<.005+	-	-	-	-	-	-
Aspartate	-	-	<.05+	-	-	-	-	-	-
Choline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Créatine	-	-	<.05+	<.05+	<.05+	<.05+	-	<.05+	<.05+
GABA	<.05+	<.05+	<.05+	-	-	-	-	-	-
Glutamine	<.05+	<.05+	<.05+	-	-	-	<.05+	<.005+	<.005+
Glutamate	-	-	-	-	-	-	-	<.05+	<.005+
Glycine	<.05+	<.05+	<.01+	-	-	-	-	-	-
Lactate	-	-	<.05+	-	-	-	<.05+	<.05+	<.05+
myo-inositol	-	<.05+	<.05+	-	-	-	-	-	<.05+
NAA	-	-	-	-	-	-	-	-	<.005+
Phosphocholine	-	-	<.05+	-	-	-	-	-	-
Phosphocréatine	-	-	-	-	<.05-	<.05-	-	-	-
Taurine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valine	-	-	<.05+	-	-	-	-	-	-

**Tableau 10:** Résumé des différences statistiquement significatives de concentrations en métabolites après différents temps d'acquisition (10 min, 4h et 15h) pour des biopsies cérébrales de rats après fixation par immersion dans l'azote liquide (groupe FN), par microondes pulsées (groupe MWp) et azote liquide suivi de microondes domestiques (groupe FN+MWd). Un test non paramétrique pour échantillons appariés a été appliqué. Tableau issu de Detour et al. (2011).

La figure 25 représente les modèles intégrant l'ensemble des spectres acquis sur une durée de 15 heures (un spectre toutes les 10 minutes puis à 4h, 6h, 8h, 12h, et 15h pour un même échantillon). On constate graphiquement une dérive pour les échantillons issus du groupe FN. Dans le même temps les concentrations rapportées pour les différents métabolites des échantillons des groupes MWp et FN+MWd apparaissent stables au cours du temps. Dans tous les modèles la variance expliquée par la méthode de fixation était supérieure à 60% et la valeur prédictive évaluée par l'indice Q<sup>2</sup> était systématiquement supérieure à 0,5. Ainsi cette analyse multivariée semble confirmer l'impact des méthodes de fixation dans l'analyse du métabolome cérébral.



**Figure 24.** Représentation graphique des concentrations relatives moyennes au cours du temps de chaque métabolite pour chaque technique de fixation : immersion immédiate dans l'azote liquide (FN groupe, en bleu), exposition préalable à des microondes pulsées (MWp groupe, rouge), exposition à des microondes non pulsées (FN+Mwd groupe, en vert). Des spectres ont été acquis toutes les 10 minutes pendant les 2 premières heures puis à 4, 6, 12 et 15h. L'ordonnée exprime la concentration relative en nmol.mg<sup>-1</sup> de tissu. L'axe des abscisses représente le temps (h). Figure issue de Detour et al. (2011).



**Figure 25.** Représentation graphique des modèles ACP effectuée à partir des acquisitions RMN  $^1\text{H}$  HRMAS basée sur leurs deux premières composantes. L'ensemble des modèles représentés à gauche de la figure ont été réalisés en tenant compte de l'ensemble des régions spectrales graphiques (A, C, E). L'ensemble des modèles représentés à droite tiennent compte des régions spectrales de 16 métabolites (B, D, F). Chaque modèle intègre 2 ou 3 groupes en fonction de la méthode de fixation : technique classique d'immersion dans l'azote liquide (FN group, carrés pleins), exposition préalable à des microondes pulsées (MWp group, carrés vides), exposition à des microondes non pulsées (FN+MWd group, carrés violets). Pour chaque groupe la totalité des spectres a été intégrée dans l'analyse soit 16 spectres par échantillon. Figure issue de Detour et al. (2011). Valeurs respectives des  $R^2X$  et  $Q^2$  : 0,769 et 0,758 (25A) ; 0,693 et 0,640 (25B) ; 0,741 et 0,730 (25C) ; 0,654 et 0,627 (25D) ; 0,617 et 0,600 (25E) ; 0,570 et 0,528 (25F).



## 1.4 Discussion

Cette expérience visait à étudier les méthodes de fixation pour l'étude du métabolome cérébral chez le rat par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H HRMAS. Depuis le début des années 80, de nombreux travaux ont rapporté l'avantage de recourir à la méthode de microondes pulsées. Cet avantage réside essentiellement dans la limitation de l'initiation d'un métabolisme anaérobie. Nos travaux confirment cet avantage par comparaison directe avec une technique classique de conservation des tissus biologiques. Les concentrations en alanine (Ala), lactate (Lac) et phosphocréatine (PCr) sont significativement différentes entre fixation par microondes pulsées et immersion instantanée dans l'azote liquide. Ces métabolites sont labiles et sont associés à l'initiation de la glycolyse anaérobie postmortem. La concentration en lactate est deux fois et la concentration en phosphocréatine est plus cinq fois supérieure dans le groupe microondes pulsées. Lust et al. (1980) indiquent que la PCr est consommée très rapidement dès l'initiation du métabolisme anaérobie afin de maintenir la concentration en ATP constante. Par ailleurs, les microondes pulsées semblent également limiter les dégradations métaboliques postmortem. Le GABA a une concentration supérieure dans le groupe microondes pulsées. Ce résultat semble en rapport avec une potentielle dégradation métabolique postmortem très rapide (quelques minutes après le sacrifice) par l'action de l'enzyme GAD (glutamic acide decarboxylase ; Geddes et al., 1999). Au total 11 des 16 métabolites mesurés présentent une concentration significativement différente entre les deux groupes. On note que des métabolites impliqués dans le métabolisme de certains neurotransmetteurs présentent des concentrations différentes dans les deux groupes (GABA, glutamine, glutamate, aspartate). Par ailleurs les concentrations rapportées dans le groupe microondes pulsées sont proches de celles rapportées par Risa et al. (2008) selon les mêmes méthodologies (analyse par RMN <sup>1</sup>H HRMAS et recours aux microondes pulsées). Ces données semblent confirmer les avantages procurés par la méthode des microondes pulsées à savoir une fixation rapide *in vivo* et irréversible du métabolome. Dès 1980, Medina et al. suggéraient que l'action essentielle des microondes permettait une altération irréversible des enzymes cérébrales rendant ainsi tout processus ischémique et/ou de dégradation métabolique postmortem impossible. Cette altération est imputée à une élévation transitoire et rapide de la température sur le parcours du faisceau délivrant les ondes, de l'ordre de 80 à 90°C pendant une à deux secondes. Cette élévation de température a pour conséquence l'échauffement brutal et transitoire des tissus provoquant une modification de conformation des enzymes rendant ainsi impossible la transformation de leurs substrats habituels. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par De Graaf et al. (2009) en IRM morphologique et spectroscopie *in vivo* chez le rat. Les auteurs ont également eu recours aux microondes haute énergie pulsées comme méthode

de sacrifice. Ils indiquent que les concentrations en métabolites observées à la suite d'un sacrifice par microondes pulsées sont identiques à celle observées *in vivo*. De plus l'IRM morphologique pratiquée après un tel sacrifice montre une intégrité totale des tissus. Ces éléments récents confirment les observations neurohistologiques réalisées par Login and Dvorak (1994) qui concluaient également à une très faible incidence des microondes pulsées quant à l'aspect morphologique cellulaire et subcellulaire des neurones. Malgré ces observations nous ne pouvons pas totalement exclure que l'échauffement, même transitoire des échantillons, provoque une dessiccation partielle des tissus. Cette dessiccation pourrait provoquer une sorte de « piégeage » des métabolites au sein de protéines présentes dans l'environnement direct des métabolites étudiés. Cette transformation aurait ainsi pour conséquence de modifier pour chaque métabolite la proportion des métabolites « visibles » et « invisibles en RMN HRMAS ». En effet le concept de métabolite visible et invisible en RMN HRMAS reste débattu et n'a fait l'objet que de peu d'études. Toutefois on note que d'autres études ont eu recours aux microondes pulsées comme technique de fixation pour l'étude par exemple des concentrations en prostaglandines cérébrales à l'aide la technique de spectrométrie de masse (Golovko and Murphy, 2008) et aucun phénomène de ce type n'a été observé. Les auteurs mettent également en avant les avantages procurées par les microondes pulsées pour le dosage des ces métabolites cérébraux extrêmement labiles. Cependant cette problématique visible/invisible pourrait d'avantage s'appliquer au groupe des biopsies ayant subi une exposition aux microondes domestiques. Pour rappel cette exposition et l'élévation de température induite était plus longue (20s, 850 W). Effectivement macroscopiquement les échantillons biologiques prélevés montraient des propriétés mécaniques différentes suggérant ainsi une altération protéique et/ou cellulaire. Les concentrations en métabolites rapportées sont plus difficiles à interpréter. Dans l'ensemble il apparaît indiscutable que le recours aux microondes pulsées permet une meilleure quantification des métabolites intracérébraux. Il s'agit à notre connaissance de la première étude ayant spécifiquement adressé cette question par la méthode d'analyse RMN  $^1\text{H}$  HRMAS.

Le second avantage, qui à notre connaissance est rapportée pour la première fois, est l'impressionnante stabilité des signaux RMN observés après de longues périodes de rotation de l'échantillon. Un désavantage de la RMN HMRAS est le besoin d'appliquer une rotation haute fréquence aux échantillons durant l'acquisition (typiquement entre 3000 et 5000 Hz). Pour des acquisitions de courte durée (inférieur à 30 min.) les conséquences de cette rotation semblent limitées. Cependant il n'est pas rare d'avoir recours à des durées d'acquisition nettement plus élevées dès lors que l'on a recours à des séquences RMN bidimensionnelles (souvent plusieurs heures). Opstad et al. (2008) suggèrent que la rotation des échantillons pendant des périodes supérieures à 30 minutes a un effet sur les concentrations en métabolites. Nos résultats indiquent que

pour des périodes d'acquisition (et donc de rotation) de 15 heures, seuls 2 métabolites sur 16 montrent une variation de signal (et donc de concentration) au cours du temps dans le groupe microondes pulsées. Ce chiffre est de 11 pour le groupe azote liquide et de 6 pour le groupe exposé aux microondes domestiques. Le mécanisme biophysique par lequel l'irradiation par microondes pulsées haute énergie rendent les échantillons aussi stables reste à déterminer. Toutefois plusieurs éléments peuvent être discutés. Tout d'abord la possible dégradation de l'échantillon au cours du temps. Les acquisitions RMN HRMAS se déroulent à 4°C, à cette température une activité enzymatique résiduelle dans les échantillons fixés à l'azote liquide est possible. Ainsi des variations biochimiques *in situ* peuvent se produire lors de longues périodes d'acquisition. De plus des variations biochimiques peuvent également être induites par dégradation de l'échantillon du fait de la rotation. Ainsi le stress mécanique appliqué aux échantillons pourrait potentiellement altérer l'échantillon et modifier les concentrations en métabolites. Enfin une autre hypothèse est en lien avec le concept de métabolites visibles/invisibles en RMN déjà évoqué plus haut. Il a été montré que l'environnement protéique couplé ou non à des effets de transfert de polarisation magnétique pouvaient modifier la détectabilité de certaines métabolites (De Graaf et al., 1999 ; Kaupinen and Williams, 1991). Middleton et al. (1998) évoquent même un effet d'une congélation préalable sur les concentrations mesurées de certains métabolites. De notre point de vue l'explication la plus plausible serait une modification physique des échantillons du fait d'une dessiccation partielle suite à l'application des microondes pulsées haute énergie. Il en résulterait des propriétés mécaniques plus résistantes des échantillons vis-à-vis de la rotation avec *in fine* moins de variations biochimiques *in situ*. Cette observation permettrait également de rendre compte des résultats observés dans le groupe microondes domestiques.

**En conclusion notre travail confirme que les microondes pulsées représentent la meilleure méthode de fixation pour l'étude du métabolome cérébral. Cette technique apparaît particulièrement adaptée aux méthodes RMN HRMAS qui requièrent parfois de longues durées d'acquisition pour obtenir un rapport signal sur bruit acceptable. Nous avons montré une stabilité biochimique exceptionnelle des échantillons cérébraux pour une durée d'acquisition de 15h. Nous pensons que cette technique de fixation permettrait d'optimiser et fiabiliser les analyses RMN HRMAS. Ces résultats suggèrent la mise au point de dispositifs dédiés pour la préparation de toutes sortes de biopsies actuellement analysées à l'aide de cette technique.**

## **EXPERIENCE 2 :**

**Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) du modèle lithium-pilocarpine à l'aide de substrats marqués au carbone 13 pour l'étude différentielle des voies métaboliques gliales et neuronales**

## 2. EXPERIENCE 2 : Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ) du modèle lithium-pilocarpine à l'aide de substrats marqués au carbone 13 pour l'étude différentielle des voies métaboliques gliales et neuronales

### 2.1 Objectifs

Pour cette seconde expérience, nous poursuivons un triple objectif: (i) implémenter les méthodes d'investigations RMN HRMAS pour l'analyse de tissus cérébraux enrichis en substrats marqués au carbone 13 (ii) établir une comparaison entre les deux méthodes analytiques (liquide vs semi-solide) (iii) caractériser le modèle d'un point de vue métabolomique par l'apport de méthodes statistiques multivariées et confronter la validité du modèle par comparaison aux données obtenues chez l'homme.

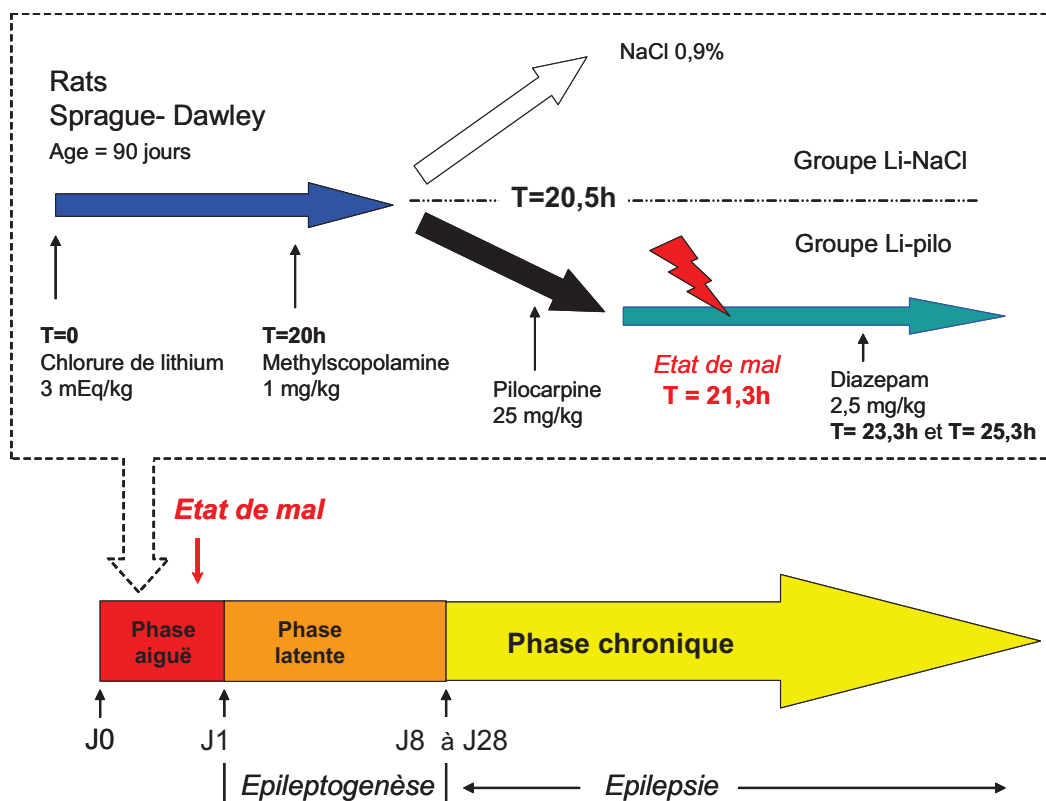
### 2.2 Matériel et méthodes

#### 2.2.1 Induction de l'état de mal épileptique

La figure 26 ci-dessous décrit le protocole expérimental classique d'induction de l'état de mal épileptique tel que pratiqué dans notre équipe pour les nombreux travaux déjà publiés (Detour et al., 2005).

Un total de 22 rats adultes Sprague-Dawley (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) ont été sélectionnés pour l'étude. Les animaux ont été maintenus à la température ambiante sous un cycle de lumière/obscurité normal (12h-12h ; lumière à 7h00). L'eau et la nourriture leur étaient fournis *ad libidum*. Toutes les expériences ont été effectuées conformément aux règles des directives européennes 86/609/CEE et 2010/63/UE, de l'ordonnance du 5 janvier 2012 (ordonnance n°2012-10) et le ministère français de l'agriculture (licence N° 67/97). Douze rats ont subi l'induction d'un état de mal épileptique. Deux rats sont décédés dans les deux heures qui ont suivi l'état de mal. Trois rats n'ont présenté aucun symptôme d'état de mal et ont donc été retirés de l'étude. Après un délai de 15 jours les rats étaient observés à l'aide d'un dispositif vidéo afin de confirmer l'apparition de

crises récurrentes spontanées. Au total 9 rats présentaient des crises récurrentes spontanées (groupe Li-pilo). L'observation s'arrêtait dès lors que chaque rat avait montré au minimum une crise spontanée. Le groupe de rats témoins était au nombre de 8 (groupe Li-NaCl).



**Figure 26.** Schéma expérimental pour l'induction de l'état de mal épileptique dans le modèle lithium-pilocarpine.

### 2.2.2 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques

Le protocole de prélèvement des tissus cérébraux dans le cas de cette expérience peut être apparenté à la méthodologie appliquée dans le cadre de l'expérience 1 au groupe azote liquide (groupe FN). Cependant cette expérience avait pour objet de d'étudier de manière simultanée les métabolismes neuronaux et astrocytaires à l'aide de substrats marqués au carbone 13. Ainsi quinze minutes avant le sacrifice, chaque animal subissait une injection intra-péritonéale de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et de  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate (Laboratoires Cambridge Isotopes, Woburn, Etats-Unis) à la dose de 3 mmol/kg. Ce protocole est inspiré de Melo et al. (2005). Au moment de l'injection les rats avaient un

poids moyen de  $502\pm 41$  g pour le groupe Li-NaCl et  $542\pm 79$  g pour le groupe Li-pilo (différence non significative ; Test de Mann-Whitney,  $U = 16$ ,  $p = 0.064$ ). Quinze minutes après l'injection, chaque rat subissait une dislocation cervicale suivie d'une décapitation et d'une immersion immédiate dans l'azote liquide, pour se mettre dans les mêmes conditions que les prélèvements cliniques en bloc opératoire. La procédure de préparation des inserts suit celle du groupe FN de l'expérience n°1. Pour chaque rat cinq régions cérébrales étaient prélevées : cortex entorhinal, hippocampe, cortex cérébral, thalamus, substance noire du tronc cérébrale.

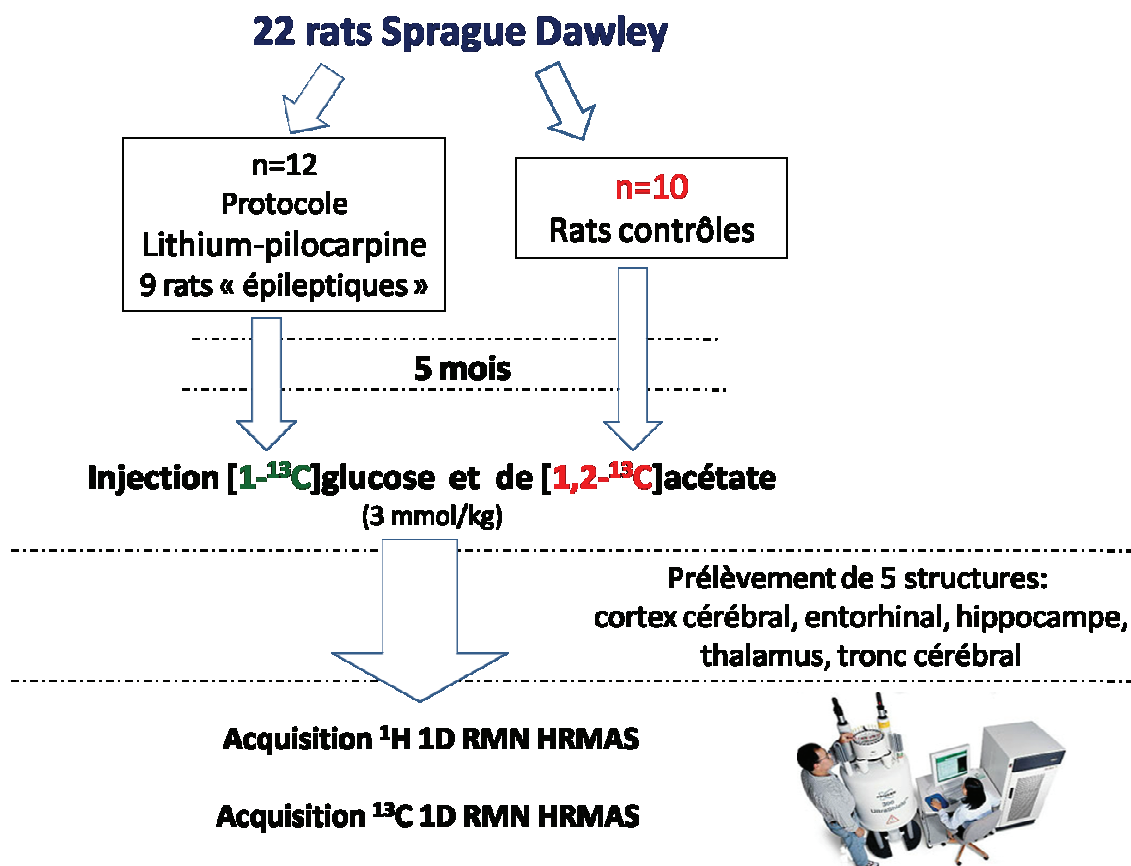


Figure 27. Protocole expérimental de l'étude du modèle lithium-pilocarpine par RMN HRMAS.

### 2.2.3 Acquisition des spectres $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS

La méthodologie suit celle décrite dans l'expérience 1 (paragraphe 1.2.3 de la partie expérimentale).

### 2.2.4 Acquisition des spectres $^{13}\text{C}$ 1D RMN HRMAS

Les caractéristiques du carbone 13 sont une faible abondance naturelle (1,1%), et un rapport gyromagnétique 4 fois plus faible que celui du proton. C'est pourquoi l'enrichissement du milieu à l'aide de substrats marqués au carbone 13 est nécessaire pour les études du métabolisme par SRMN. C'est d'autant plus un avantage que la substitution d'un carbone 12 par un carbone 13 ne modifie pas les voies métaboliques dans lesquelles sont impliquées ces substrats. La séquence utilisée est une séquence permettant l'obtention de signaux directs de l'élément carbone 13. Ce type d'approche impose de réaliser un découplage du proton afin de gagner en sensibilité et de simplifier le nombre de raies obtenues dans le spectre. La séquence appliquée est de type « zgpg » implémentée sur les spectromètres Bruker. Les paramètres suivants ont été appliqués : nombre de scans = 24 000 ; largeur de bande 236 ppm ; angle =  $30^\circ\text{C}$  ; temps d'acquisition = 1,1 s ; résolution 32K. Un étalon interne d'éthylène glycol a été ajouté aux échantillons. Afin d'exploiter les possibilités d'une quantification, il est nécessaire de tenir compte de l'effet Overhauser ou NOE (Nuclear Overhauser Effect). L'effet NOE est un transfert de polarisation entre spins (par exemple de  $^1\text{H}$  vers  $^{13}\text{C}$ ). Pour limiter cet effet il est commun d'utiliser une séquence capable de minimiser cet effet. En anglais cette séquence est appelée *inverse power gated broad band decoupled sequence*. L'excitation impulsionnelle n'est appliquée que durant la phase d'acquisition et s'arrête avant le début de la phase de relaxation. Dans ce cas précis le transfert de polarisation est minimisé rendant ainsi la quantification possible. En pratique il est possible d'utiliser une séquence impulsionnelle pendant l'acquisition et la relaxation afin d'obtenir un découplage proton maximal (*broadband decoupling proton*) par contre il est nécessaire, pour chaque métabolite d'évaluer le facteur correctif permettant de tenir compte de l'effet NOE. Evaluer le facteur correctif de chaque métabolite impose d'effectuer des acquisitions extrêmement longues pour permettre un temps de relaxation maximal. Ce travail est actuellement en cours. Aussi dans notre manuscrit la concentration en métabolites marqués ne tient pas compte de cet effet et les unités rapportées sont des unités arbitraires.



Considérant cet effet identique dans les deux groupes d'animaux, une telle approximation permet tout de même d'effectuer les comparaisons entre les deux groupes.

### 2.2.5 Traitement des données et analyses statistiques

La méthodologie suit celle décrite dans l'expérience 1 (paragraphe 1.2.4 de la partie expérimentale) excepté l'application d'une analyse discriminante par régression aux moindres carrés partiels (PLS-DA) en lieu et place d'une analyse de type PCA. Les matrices d'analyses sont identiques.

L'évaluation de la qualité de l'ajustement des données est effectuée à l'aide de trois indices. L'indice  $R^2Y$  indique la part de la variance expliquée par le modèle issue des variables Y, l'indice  $R^2X$  fait de même pour les variables X. L'indice  $Q^2$  est une mesure globale de la qualité de l'ajustement du modèle et de sa qualité prédictive. La qualité de l'ajustement est jugée satisfaisante lorsque la valeur  $Q^2$  est comprise entre 0,5 et 1. Cet indice est dépendant du nombre de composantes prises en compte pour décrire les données. Un indice  $Q^2$  cumulatif ( $Q^2$  cum) peut ainsi être défini. Une progression de cet indice vers 1 avec l'ajout de composantes pour la description du modèle suggère la présence de covariables non prises en compte dans le modèle.

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Quantification des métabolites par $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS

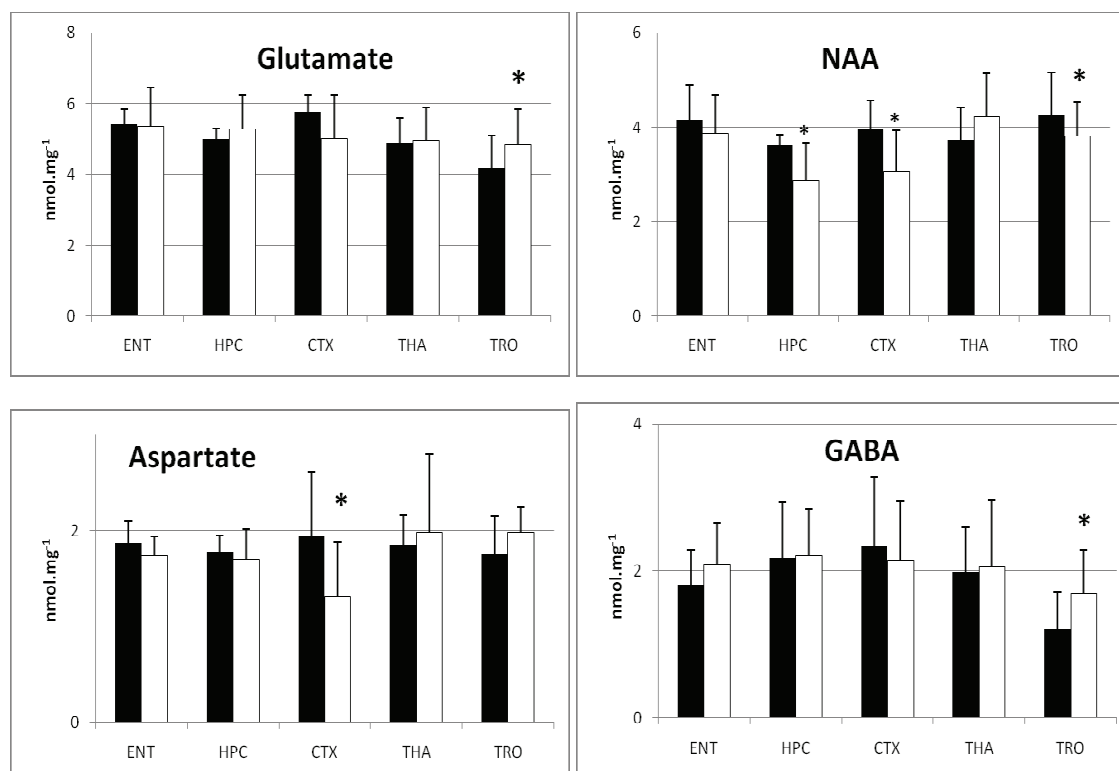
Les tableaux 11 et 12 rapportent les concentrations moyennes de chaque métabolite en fonction du groupe d'animaux (Li-NaCl et Li-pilo) pour chaque structure cérébrale étudiée : cortex entorhinal, hippocampe, cortex, thalamus et du tronc cérébral.

	Cortex entorhinal		Hippocampe		Cortex cérébral	
	Li-NaCl	Li-pilo	Li-NaCl	Li-pilo	Li-NaCl	Li-pilo
Glu	5,41 ±0,44	5,07 ±1,08	5,00 ±0,29	5,29 ±0,96	5,76 ±0,47	5,01 ±1,22
Succ	0,07 ±0,02	0,07 ±0,02	0,07 ±0,01	0,08 ±0,03	0,08 ±0,02	0,08 ±0,02
NAA	4,15 ±0,75	3,87 ±0,80	3,61 ±0,23	2,87 ±0,81*	3,97 ±0,59	3,06 ±0,88*
Asc	0,21 ±0,13	0,27 ±0,12	0,21 ±0,04	0,34 ±0,15*	0,30 ±0,15	0,27 ±0,13
GPCho	0,28 ±0,16	0,29 ±0,08	0,27 ±0,12	0,36 ±0,09	0,24 ±0,12	0,36 ±0,07
Lac	3,95 ±1,38	4,38 ±1,05	3,99 ±0,69	4,04 ±0,95	4,44 ±1,51	4,56 ±1,04
GABA	1,81 ±0,48	2,09 ±0,56	2,18 ±0,76	2,20 ±0,64	2,35 ±1,13	2,14 ±0,82
Cr	2,84 ±0,77	3,00 ±0,61	2,79 ±0,27	3,12 ±0,66*	2,97 ±0,72	3,16 ±0,46
Ala	0,30 ±0,06	0,32 ±0,08	0,32 ±0,07	0,33 ±0,08	0,37 ±0,08	0,36 ±0,11
Gln	2,37 ±0,33	1,99 ±0,28	2,00 ±0,14	1,67 ±0,37	2,14 ±0,30	2,03 ±0,60
Val	0,02 ±0,01	0,01 ±0,01*	0,02 ±0,01	0,02 ±0,01	0,02 ±0,01	0,02 ±0,01
Asp	1,96 ±0,23	1,74 ±0,20	1,78 ±0,17	1,70 ±0,31	1,94 ±1,31	0,77 ±0,67*
Cho	0,79 ±0,23	0,86 ±0,21	0,86 ±0,20	0,90 ±0,27	0,68 ±0,26	0,88 ±0,37
Tau	3,09 ±0,42	3,45 ±1,00	3,33 ±0,56	4,00 ±0,75*	3,90 ±0,76	4,10 ±1,07
PCho	0,36 ±0,13	0,32 ±0,09	0,42 ±0,11	0,49 ±0,11	0,37 ±0,23	0,46 ±0,20
Ace	0,32 ±0,10	0,34 ±0,10	0,40 ±0,15	0,37 ±0,10	0,39 ±0,15	0,33 ±0,10
mIns	4,11 ±0,85	4,35 ±0,92	4,17 ±0,80	4,39 ±0,99	4,06 ±1,04	4,48 ±1,18
Gly	1,38 ±0,41	1,50 ±0,35	1,36 ±0,36	1,43 ±0,39	1,68 ±0,42	1,52 ±0,52
Lys	0,54 ±0,13	0,57 ±0,14	0,59 ±0,12	0,60 ±0,18	0,69 ±0,19	0,63 ±0,26

**Tableau 11.** Comparaison des concentrations en métabolites mesurées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo) en fonction de chaque structure cérébrale (cortex entorhinal, hippocampe, cortex cérébral). Les résultats indiquent des moyennes (en nmol.mg $^{-1}$  de tissu)  $\pm$  l'écart-type. \*: différence significative à  $p < 0.05$  entre le groupe li-NaCl et Li-pilo (Test U de Mann-Whitney); \*\*: différence significative à  $p < 0.01$  entre le groupe li-NaCl et Li-pilo (Test U de Mann-Whitney).

	Thalamus		Tronc cérébral	
	Li-NaCl	Li-pilo	Li-NaCl	Li-pilo
Glu	4,89 ±0,71	4,95 ±0,95	4,17 ±0,93	4,83 ±1,01*
Succ	0,06 ±0,02	0,07 ±0,03	0,05 ±0,02	0,07 ±0,02
NAA	3,73 ±0,69	4,22 ±0,92	4,25 ±0,92	3,81 ±0,71*
Asc	0,16 ±0,10	0,19 ±0,11	0,24 ±0,22	0,17 ±0,06
GPCho	0,27 ±0,10	0,23 ±0,08	0,21 ±0,08	0,23 ±0,03
Lac	3,77 ±0,99	3,96 ±1,25	4,37 ±3,11	4,38 ±0,77
GABA	1,99 ±0,61	2,06 ±0,91	1,20 ±0,51	1,70 ±0,58*
Cr	2,61 ±0,50	2,71 ±0,57	3,66 ±1,44	2,88 ±0,44*
Naa	4,32 ±0,62	3,88 ±0,88	2,86 ±0,83	2,44 ±0,76
Ala	0,26 ±0,08	0,39 ±0,35	0,29 ±0,11	0,53 ±0,06*
Gln	1,91 ±0,21	1,92 ±0,28	1,90 ±0,32	1,97 ±0,20
Val	0,02 ±0,01	0,05 ±0,09	0,02 ±0,01	0,03 ±0,01
Asp	1,85 ±0,31	1,98 ±0,82	1,75 ±0,40	1,98 ±0,27
Cho	0,70 ±0,20	0,81 ±0,34	0,65 ±0,26	0,80 ±0,23
Tau	3,55 ±0,54	3,99 ±0,89	3,94 ±1,75	3,49 ±0,89
PCho	0,33 ±0,09	0,30 ±0,12	0,26 ±0,07	0,29 ±0,08
Ace	0,36 ±0,12	0,51 ±0,51	0,24 ±0,10	0,35 ±0,07*
mIns	3,83 ±1,12	4,30 ±1,76*	3,56 ±1,57	3,90 ±0,91
Gly	1,27 ±0,38	1,71 ±1,34	1,42 ±0,57	2,10 ±0,50*
Lys	0,57 ±0,17	0,74 ±0,57	0,58 ±0,20	0,81 ±0,20*

**Tableau 12.** Comparaison des concentrations en métabolites mesurés par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo) en fonction de chaque structure cérébrale (thalamus, tronc cérébral). Les résultats indiquent des moyennes (en  $\text{nmol.mg}^{-1}$  de tissu)  $\pm$  l'écart-type. \* : différence significative à  $p < 0.05$  entre le groupe Li-NaCl et Li-pilo (Test U de Mann-Whitney) ; \*\* : différence significative à  $p < 0.01$  entre le groupe Li-NaCl et Li-pilo (Test U de Mann-Whitney)

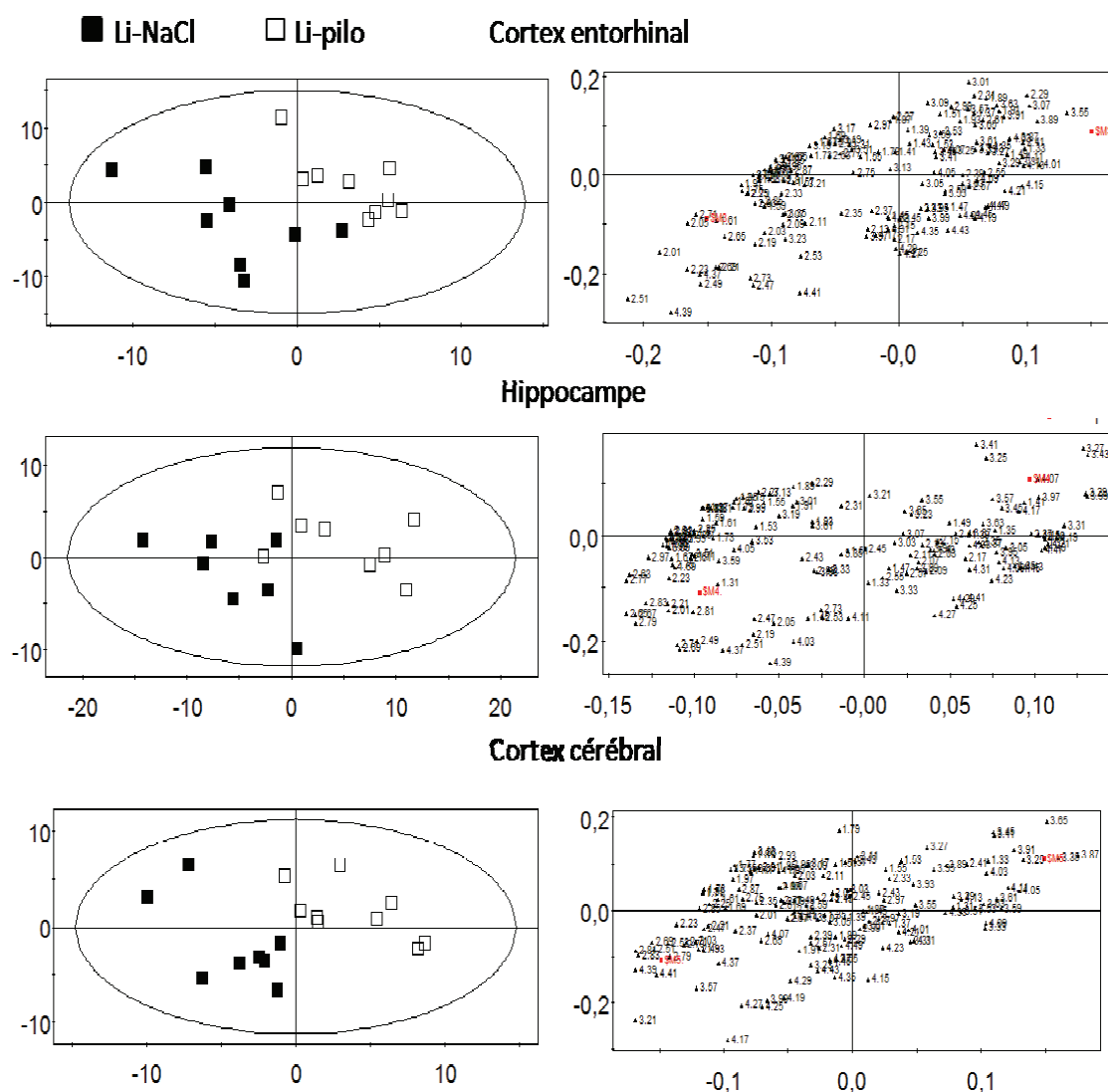


**Figure 28.** Représentation graphique des concentrations en nmol.mg<sup>-1</sup> (glutamate, N-acétylaspartate (NAA), GABA, aspartate) mesurées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour chacun des groupes de rats (Li-NaCl en noir ou Li-pilo en blanc) en fonction de la structure cérébrale. ENT : cortex entorhinal ; HPC : hippocampe ; CTX : cortex cérébral ; THA : thalamus ; TRO : tronc cérébral. Les valeurs représentent les moyennes en nmol.mg<sup>-1</sup>, les barres d'erreur les écart-types.

Les concentrations rapportées dans les tableaux 11 et 12 correspondent à des valeurs dans la gamme de celles rapportées par Risa et al. (2008) et mesurées sur des biopsies cérébrales de thalamus à l'aide de la technique RMN  $^1\text{H}$  HRMAS. De façon générale, on constate tout d'abord qu'un nombre relatif de métabolites présentent des différences significatives de concentration entre les groupes Li-NaCl et Li-pilo au regard du nombre de métabolites évalués. De plus on peut noter une dispersion supérieure des valeurs de concentrations dans le groupe Li-pilo attestée par les valeurs d'écart-type associées aux concentrations rapportées pour ce groupe (écart-type généralement plus élevé dans le groupe li-pilo comparé au groupe Li-NaCl). Concernant le cortex entorhinal seule la concentration en valine semble significativement différente entre les deux groupes. Pour l'hippocampe, on observe une augmentation significative des concentrations en ascorbate, taurine et créatine ainsi qu'une diminution significative en N-acétylaspartate dans le groupe Li-pilo. Au niveau du cortex cérébral, le N-acétylaspartate et l'aspartate semblent significativement diminués. Dans le thalamus aucune différence significative n'a été relevée pour aucun métabolite. Enfin, au niveau du tronc cérébral un grand nombre de différences significatives ont été relevées : diminution du N-acétylaspartate et de la créatine, augmentation du glutamate, de l'alanine, du GABA, de l'acétate, de

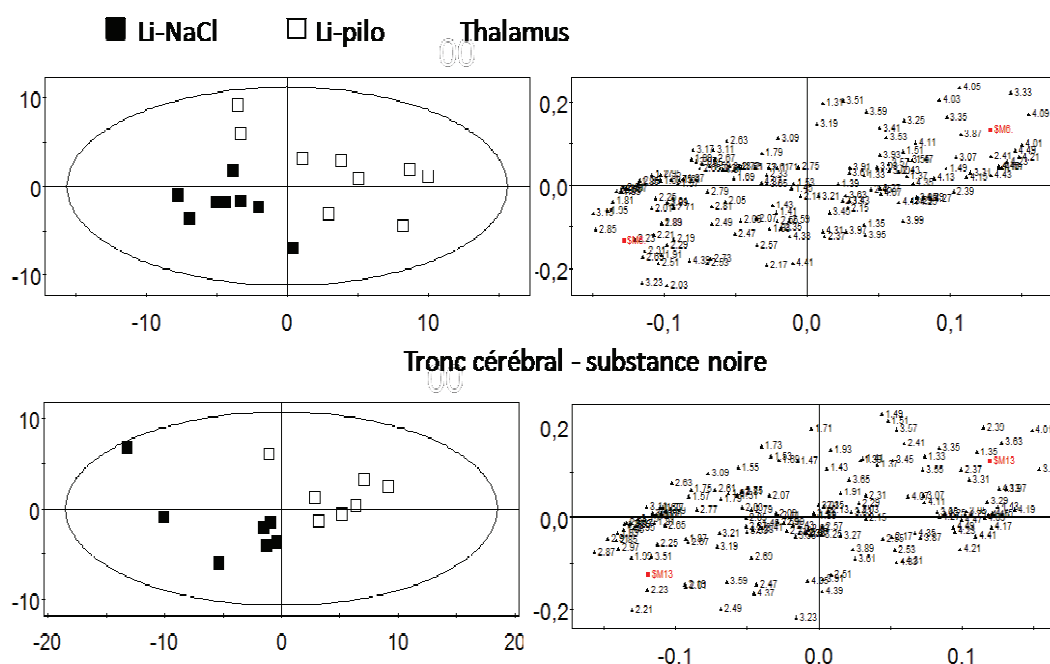
la glycine et de la lysine dans le groupe Li-pilo comparé au groupe Li-NaCl. La figure 28 représente les concentrations spécifiquement pour le glutamate, le NAA, l'aspartate et le GABA.

### 2.3.2 Analyse des données $^1\text{H}$ selon une analyse discriminante par la méthode de régression aux moindres carrés partiels (PLS-DA)



**Figure 29.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies cérébrales analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour les deux groupes de rats étudiés ; groupes Li-NaCl (carrés plein) et Li-pilo (carrés vides) pour le cortex entorhinal, l'hippocampe et le cortex cérébral. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo).

Les figures 29 et 30 représentent les résultats sous forme de nuages de points des données « protons » à la suite d'une analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels (PLS-DA) pour chaque structure cérébrale en fonction du groupe Li-NaCl et Li-pilo. Ces analyses sont basées sur les signaux  $^1\text{H}$  des régions comprises entre 0,5 et 4,6 ppm avec une discrétisation de 0,02ppm. Les figures de gauche illustrent la dispersion des échantillons de chacun des groupes selon les deux premières composantes de chaque modèle. Les figures de droite représentent la dispersion des variables obtenues par discrétisation des spectres selon les deux groupes d'échantillons.



**Figure 30.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies cérébrales analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS pour les deux groupes de rats étudiés ; groupes Li-NaCl (carrés plein) et Li-pilo (carrés vides) pour le thalamus et le tronc cérébral. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo).

Le tableau 13 ci-dessous résume les résultats statistiques observés pour chacun des modèles représentés sur les figures 29 et 30.

Structure	R <sup>2</sup> X	R <sup>2</sup> Y	Q <sup>2</sup>	Métabolites discriminants		Q <sup>2</sup> cumulatif maximum (nbr de composantes)
				groupe Li-NaCl	Groupe Li-pilo	
Cortex entorhinal	0,48	0,785	0,511	NAA, Glu, Asp, Gln	Val, mIns, GABA	0,592 (3)
Hippocampe	0,583	0,723	0,499	NAA, Asp, , Gln	Tau, Cho, GPCho, Pcho	0,499 (2)
Cortex cérébral	0,372	0,810	0,412	NAA, Asp	Cho, GPCho, Pcho, Cr, mIns	0,412 (2)
Thalamus	0,421	0,769	0,096			
Tronc cérébral substance noire	0,429	0,791	0,322	NAA, Cr	Ala, Glu, NAA, GABA, Ace, Gly, Lys	0,322 (2)

**Tableau 13.** Résultats statistiques des modèles PLS-DA confrontant pour chaque structure cérébrale indiquée les deux groupes de rats Li-NaCl et Li-pilo. Les valeurs R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y et Q<sup>2</sup> sont des indices de fiabilité du modèle compris entre 0 et 1 et représentent respectivement le pourcentage de variance X (les métabolites) expliqué par le modèle, le pourcentage de variance Y (groupe de rats) expliqué par le modèle et l'indice de validation soit le pourcentage de variance totale décrit par les deux premières composantes du modèle. Q<sup>2</sup> cumulatif représente le score maximum de l'indice Q<sup>2</sup> par l'ajout de composantes.

Concernant les biopsies issues du cortex entorhinal le modèle PLS-DA distingue de façon satisfaisante et prédictive (Q<sup>2</sup> > 0,5) les deux groupes. Les métabolites discriminants en faveur du groupe Li-NaCl sont le N-acétylaspartate, le glutamate, l'aspartate et la glutamine. Les métabolites discriminants du côté du groupe Li-pilo sont le myoinositol et le GABA. De plus on note que plus de 75% de la variance issue des groupes d'animaux (R<sup>2</sup>Y) peut être expliquée par les deux premières composantes décrivant le modèle, ce résultat suggère une certaine robustesse du modèle. On observe que malgré l'absence de différence statistiquement significative lors de la comparaison deux à deux des concentrations en métabolites, il est néanmoins possible de discriminer des profils métaboliques différents pour les deux groupes. Ces différences illustrent la différence de méthodologie statistique. L'approche multivariée tient compte de l'ensemble des concentrations et de leurs variances associées afin de distinguer des profils métaboliques différents. L'analyse deux à deux par test t des moyennes est appliquée pour chaque métabolite de façon isolée.

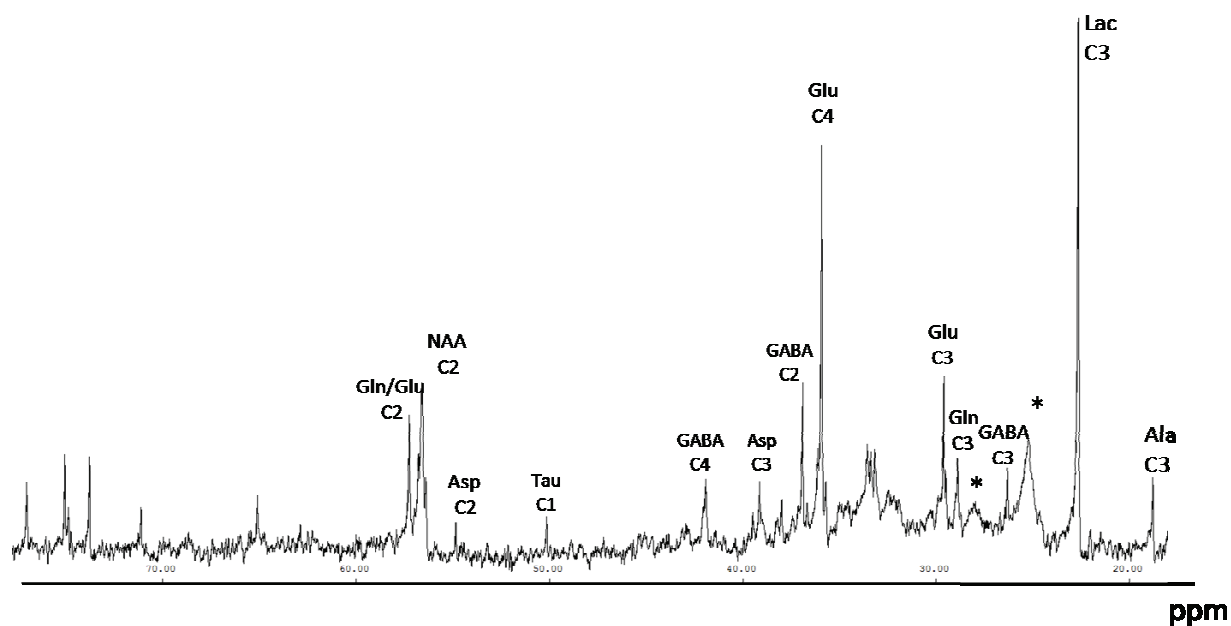
Concernant la structure hippocampique, les résultats des indicateurs sont très proches puisque la valeur de Q<sup>2</sup> est très proche de 0,5 (0,499 exactement) et les variances expliquées sont de plus de 50% pour les variables X (les spectres) et près de 75% pour les variables Y (72%). Les métabolites discriminants pour cette structure en faveur du groupe Li-NaCl sont identiques au modèle précédent excepté pour le glutamate. Ceux plutôt en faveur du groupe Li-pilo sont la taurine la phosphocholine, et la glycérphosphocholine.

Les paramètres statistiques issus de l'analyse discriminante effectuée sur les biopsies corticales montrent des résultats proches mais tout de même inférieurs. En effet sur la base des deux premières composantes, le modèle ne rend compte que de 37% de la variance X, les résultats sont en revanche satisfaisants pour la variable de groupe Y (81%). L'ensemble des variances des deux types de variables n'est expliquée qu'à hauteur de 41% ce qui est inférieur à 50% suggérant une capacité de discrimination des deux groupes non satisfaisante. N-acétylaspartate et aspartate sont associés au groupe Li-NaCl alors que les cholines et la créatine sont associées au groupe Li-pilo. Les analyses effectuées sur les acquisitions RMN  $^1\text{H}$  HRMAS de biopsies issues du thalamus ne semblent pas permettre de distinguer de façon satisfaisante les deux groupes ( $Q^2 = 0,096$ ) en conséquence aucun métabolite n'est reporté dans le tableau 13 pour ce modèle. De façon un peu plus performante mais non satisfaisante ( $Q^2 = 0,322$ ) le modèle PLS-DA tentant de décrire une éventuelle distinction de profil métabolique pour les biopsies issues du tronc cérébral suggère une caractérisation de ces deux groupes respectivement vis-à-vis du N-acétylaspartate et de l'alanine.

### 2.3.3 Résultats des acquisitions RMN 1D $^{13}\text{C}$ HRMAS pour l'analyse différentielle des métabolismes gliaux et neuronaux

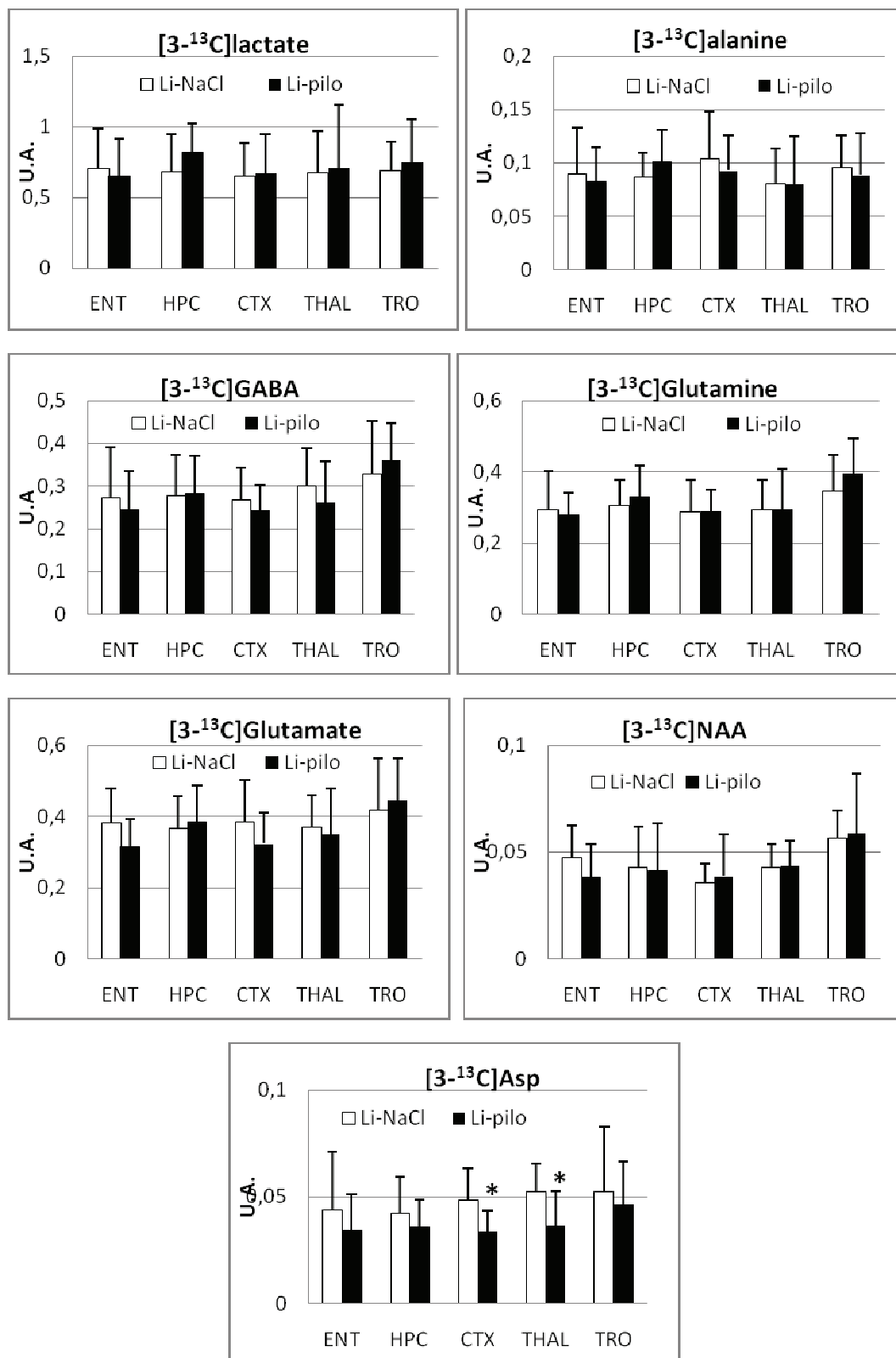
La figure 31 représente un spectre RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS typique d'une biopsie de cortex entorhinal 5 mois après l'induction d'un état de mal épileptique et l'administration concomitante de substrats marqués au carbone 13 15 minutes avant le sacrifice ( $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et de  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate). L'attribution des raies spectrales a été effectuée à partir des tables de référence (Martinez-Bisbal et al., 2004) et de spectres 2D acquis sur 3 biopsies.



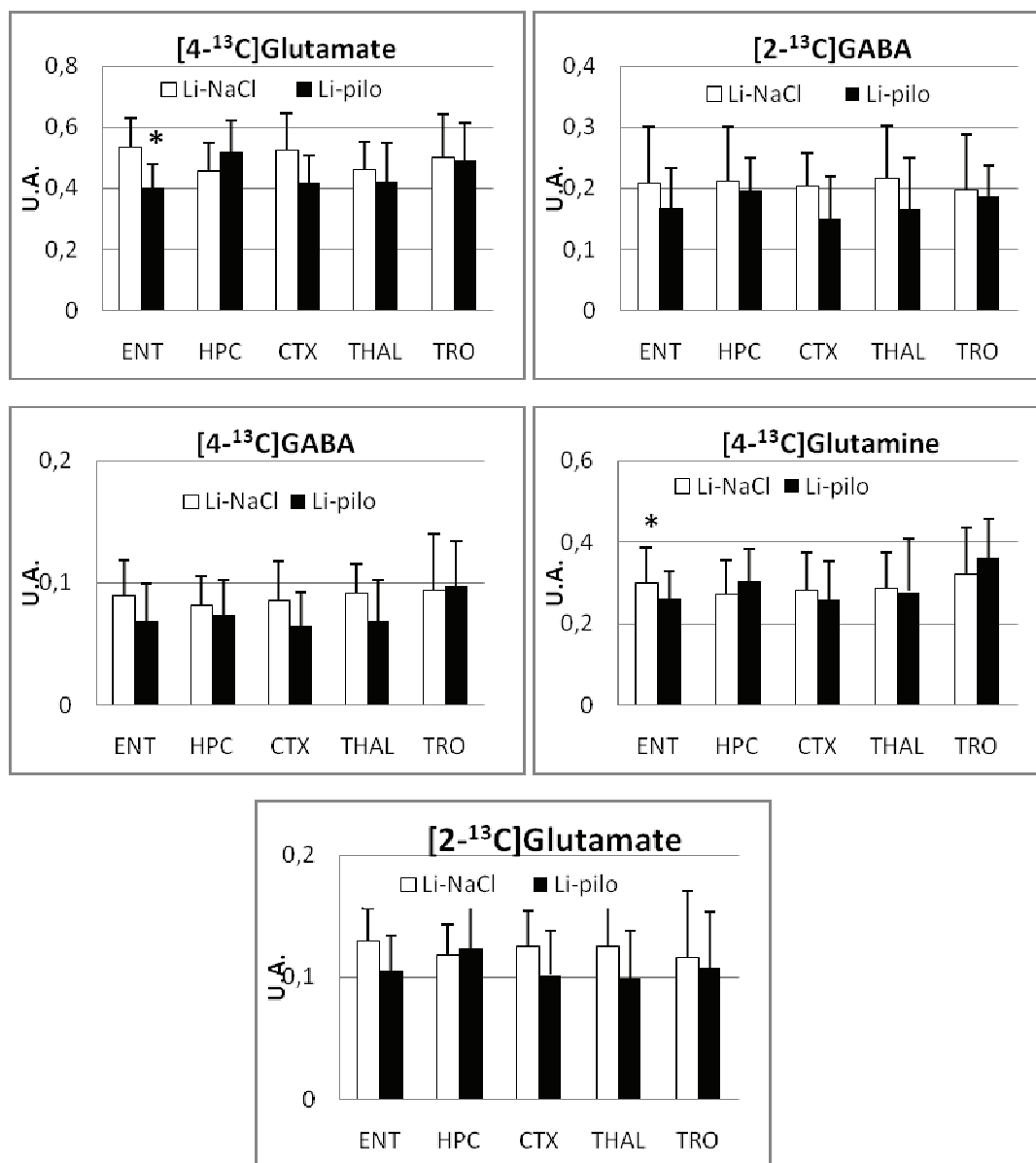


**Figure 31.** Spectre 1D RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS d'une biopsie de cortex entorhinal d'un rat Sprague-Dawley 5 mois après l'induction d'un état de mal épileptique à l'aide de lithium et de pilocarpine. \* : signaux associés aux acides gras. Ala : alanine ; Asp : aspartate ; GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; Glu : glutamate ; Gln : glutamine ; Tau : taurine. CX : position de l'atome de carbone 13.

Les figures 32 et 33 présentent les concentrations de chacun des isotopomères d'intérêt pour chaque structure cérébrale. On observe peu de différences significatives pour les isotopomères marqués en position 3 excepté pour l'aspartate au niveau du cortex et du thalamus (figure 32). En position 4 le glutamate et la glutamine apparaissent comme significativement diminués au sein du cortex entorhinal (figure 33).



**Figure 32.** Comparaison des concentrations en métabolites mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS et marquées en position 3 entre le groupe Li-NaCl et Li-pilo en unité arbitraire (u.a.) suite à la métabolisation de deux substrats coadministrés [1- $^{13}\text{C}$ ]glucose et de [1,2- $^{13}\text{C}$ ]acétate. \* : différence statistiquement significative à  $p < 0,05$  (U test de Mann-Whithney). U.A. : unité arbitraire. ENT : cortex entorhinal ; HPC : hippocampe ; CTX : cortex cérébral ; THA : thalamus ; TRO : tronc cérébral. Les valeurs représentent les moyennes en  $\text{nmol.mg}^{-1}$ , les barres d'erreur les écart-types.



**Figure 33.** Comparaison des concentrations mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS en métabolites et marqués en position 2 et 4 entre le groupe Li-NaCl et Li-pilo en unité arbitraire (u.a) suite à la métabolisation de deux substrats coadministrés  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et de  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate. \* : différence statistiquement significative à  $p < 0,05$  (U test de Mann-Whithney). U.A. : unité arbitraire. ENT : cortex entorhinal ; HPC : hippocampe ; CTX : cortex cérébral ; THA : thalamus ; TRO : tronc cérébral. Les valeurs représentent les moyennes en  $\text{nmol.mg}^{-1}$ , les barres d'erreur les écart-types.

## 2.4 Discussion

### 2.4.1 Acquisitions $^1\text{H}$ 1D RMN HRMAS et analyses multivariées

Le premier objectif de ce travail était d'évaluer le métabolome cérébral des rats li-pilo après 5 mois de crises récurrentes spontanées. On observe que le N-acétylaspartate est significativement diminué dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le tronc cérébral dans le groupe li-pilo. Cette diminution est également observable dans les deux autres structures cérébrales étudiées mais de façon non significative. La diminution de NAA au sein de l'hippocampe est en lien direct avec les pertes neuronales au sein de cette structure alors que cette diminution dans le cortex cérébral serait davantage liée à des dysfonctionnements neurométaboliques mitochondriaux (Vielhaber et al., 2003). Le glutamate est augmenté de façon significative dans le groupe li-pilo au sein du cortex cérébral dans le même temps l'aspartate est diminué de façon significative. Il s'agit là des deux seules différences significatives au sein de cette structure. Au sein de l'hippocampe on observe une augmentation de la taurine, de la créatine et de l'ascorbate. Concernant le cortex entorhinal seul un métabolite se distingue entre les deux groupes, la valine diminuée dans le groupe Li-pilo. Enfin concernant le tronc cérébral on observe de nombreuses différences significatives avec une augmentation de glutamate, de GABA, d'alanine, d'acétate, de glycine et de lysine et une diminution de N-acétylaspartate et de créatine. Les comparaisons deux à deux des concentrations en métabolites montrent un nombre relativement restreint de différences significatives entre les groupes li-pilo et li-NaCl. Ce premier résultat apparaît dans un premier temps assez surprenant compte-tenu du nombre relativement élevé de métabolites étudiés (19 au total) et des nombreuses études faisant état de perturbations neuropathologiques dans le modèle lithium-pilocarpine. Ce premier résultat peut être interprété de deux façons. La première suggère que le modèle lithium-pilocarpine présente des perturbations de concentrations en métabolites relativement restreintes. La seconde pourrait être que des mécanismes d'homéostasie cérébrale seraient à l'œuvre afin de corriger en permanence les dérives de concentrations. Nos résultats peuvent également être comparés à deux études en SRMN *in vivo* réalisés sur le modèle li-pilo. Filibian et al., (2012) montrent une augmentation progressive de myoinositol au sein de l'hippocampe pendant les 7 jours ayant suivi l'état de mal. Nous avons également retrouvé une augmentation significative de myoinositol dans le thalamus. Pour toutes les autres structures étudiées une augmentation était observée mais

celle-ci était seulement proche de la significativité (sous doute dû à un écart-type important dans le groupe li-pilo). Van der Hel et al. (2011) rapportent des diminutions de N-acétylaspartate, de GABA et de glutamate au sein de l'hippocampe 8 semaines après l'état de mal. Nous n'avons pas reproduit ces résultats excepté pour le NAA.

De plus, ces résultats peuvent être comparés à une étude relativement similaire de notre groupe. Melo et al. (2005) ont comparé les concentrations de 9 métabolites (glucose, glutamine, alanine, glutathion, succinate, créatine, phosphocréatine, ATP+ADP, NAD) chez des rats li-pilo après 90 jours de crises récurrentes spontanées. Cette étude avait recours à des étapes préalables d'extraction des métabolites par procédés chimiques et les concentrations étaient mesurées par chromatographie liquide haute performance ou RMN liquide. Les gammes de concentration rapportées pour les différents métabolites étudiés ne présentent aucune discordance majeure avec notre étude. La diminution de N-acétylaspartate était également retrouvée dans l'hippocampe et le cortex cérébral. Le glutamate était significativement diminué dans l'hippocampe, résultat que nous n'avons pas observé. L'aspartate était significativement diminué au sein de l'hippocampe, du cortex cérébral et du cervelet, nous avons observé ce résultat au sein du cortex cérébral. Ainsi une période accrue de crises récurrentes spontanées (150 jours versus 90) ne semble pas drastiquement modifier le profil métabolique des structures cérébrales étudiées. Les anomalies de concentration en aspartate et en N-acétylaspartate sont apparues concordantes entre les deux études.

L'avantage des analyses métabolomiques et de leur méthodes statistiques associées rendent possible l'analyse multivariée des données offrant ainsi une autre voie d'interprétation tenant compte non plus d'un seul métabolite de façon isolée mais de la variance de l'ensemble des concentrations au sein de l'échantillon. A notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant caractérisé un modèle murin d'ELT à l'aide d'une telle approche. Mao et al. (2007) ont appliqué la technique RMN HRMAS à l'étude du modèle d'ELT basée sur l'administration locale d'acide kaïnique. Toutefois les auteurs n'ont appliqué aucune méthode d'analyse multivariée. Green et al. (2007) ont réalisé une analyse protéomique appliquée à l'hippocampe de rats li-pilo. Les résultats que nous rapportons indiquent que des analyses de types PLS-DA permettent de distinguer des profils métaboliques clairement différents concernant le cortex entorhinal et l'hippocampe. Cette distinction semble plus difficile au niveau du cortex cérébral et du tronc cérébral. Les résultats observés au niveau du thalamus ne permettent pas de conclure de façon univoque. Ainsi le cas du cortex entorhinal est intéressant à étudier. Bien qu'un seul métabolite apparaisse significativement différent entre les deux groupes à la suite du test des moyennes de Mann-Whitney, l'analyse PLS-DA a révélé les meilleurs résultats de prédictivité des profils métaboliques parmi toutes les structures

étudiées suggérant ainsi une réelle différence entre les deux groupes du point de vue de leur métabolome. Ainsi au sein de ce modèle, les métabolites discriminants en faveur du groupe Li-NaCl sont le N-acétylaspartate, la glutamine, l'aspartate et glutamate alors que la valine, le myoinositol et le GABA discriminent d'avantage le groupe li-pilo. On note toutefois que ces métabolites étaient à la limite de la significativité après l'analyse statistique non paramétrique des moyennes par groupe. Au travers de l'ensemble des modèles présentés il ressort que le N-acétylaspartate est clairement associé au groupe li-NaCl et ce dans toutes les structures cérébrales étudiées. Ainsi la diminution de N-acétylaspartate apparaît comme un invariant métabolique du modèle lithium pilocarpine. Un résultat très proche a été observé pour l'aspartate excepté au sein du tronc cérébral. Les raisons pour lesquelles ces deux métabolites n'apparaissent pas significatifs lors de l'analyse des moyennes pourraient être expliquées par l'insuffisance des effectifs, l'importance des écarts-types au sein de l'échantillon et bien sûr les potentielles covariations associées à d'autres métabolites non étudiés par l'analyse des moyennes de concentration. Une diminution significative du ratio NAA/Cr a également été retrouvée par Lee et al. (2012) au cours d'une étude longitudinale réalisée sur 30 rats li-pilo présentant des crises récurrentes spontanées. Cette diminution a été observée en SRMN dès la phase aiguë, pendant la phase silencieuse et au cours de la phase chronique. Aucune variation significative par rapport aux animaux témoins n'a été observé pour le rapport Cho/Cr et ce à aucune des trois périodes. Van Eijdsen et al. (2004) avait déjà rapporté une diminution de NAA dans les heures qui suivaient l'état de mal, la choline était également diminuée et le lactate en augmentation au sein de l'hippocampe. Une autre observation concernant les modèles présentés apparaît dans le fait que les métabolites discriminants en faveur du groupe li-pilo semblent plus hétérogènes. Ainsi le myoinositol apparaît discriminant pour le cortex entorhinal et le cortex cérébral des rats li-pilo alors que les dérivés des cholines sont associés à l'hippocampe et au cortex cérébral de ce même groupe. Le myoinositol semble augmenté dans l'hippocampe sclérotique de patients atteints d'ELT (Hammen et al., 2008 ; Mueller et al., 2003 ; Wellard et al., 2003). Cette augmentation est par ailleurs corrélée à l'expression d'un marqueur glial, la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein ; Hammen et al., 2008). Plusieurs auteurs considèrent le myoinositol comme un marqueur glial (Filibian et al., 2012 ; Schuhmann et al., 2003 Ross et al., 1996 ). Concernant la choline et ses dérivés phosphocholine et glycérophosphocholine, une augmentation de choline a été observée dans l'hippocampe de rats li-pilo (Filibian et al., 2012 ; Van Eijdsen et al., 2004) mais contredite plus récemment par Lee et al. (2012). Plusieurs études chez l'homme suggèrent une anomalie de concentration en choline au sein des structures temporomésiales (Mueller et al., 2011 ; Simister et al., 2002 ; Ende et al., 1997 ; Lu et al., 1997; Hetherington et al., 1995). Lu et al. (1997) suggèrent même que cette diminution est corrélée à la fixation de  $^{18}\text{F}$ -fluorodésoxyglucose. Dans l'ensemble nos modèles supportent de

nombreuses données de la littérature. Bien que des augmentations non significatives de la choline et du myoinositol sont observables dans l'hippocampe, ces modifications de concentration ne semblent pas être discriminantes entre le groupe li-pilo et le groupe li-NaCl. La question consistant à savoir pourquoi les augmentations de concentrations en myoinositol et cholines dans le groupe li-pilo apparaissent davantage discriminants au sein des cortex entorhinal et cérébral plutôt que l'hippocampe mériterait des investigations complémentaires. Dans l'ensemble notre caractérisation métabolomique du modèle d'ELT li-pilo suggère une différenciation claire du métabolome des groupes li-NaCl et li-pilo au sein de l'hippocampe et du cortex entorhinal.

#### 2.4.2 Acquisitions $^{13}\text{C}$ 1D RMN HRMAS

Il s'agit ici de la première étude tentant de caractériser simultanément les métabolismes neuronaux et astrocytaires par la technique RMN  $^{13}\text{C}$  HRMAS à l'aide de substrats marqués au carbone 13 ([1- $^{13}\text{C}$ ]glucose et de [1,2- $^{13}\text{C}$ ]acétate). Il s'agissait dans un premier temps d'une étude de faisabilité compte tenu du faible nombre de publications directement comparables d'un point de vue méthodologique (Delgado et al., 2011 ; Violante et al., 2009 ; Risa et al., 2008). Notre étude n'est toutefois que la reproduction d'un travail précédent de notre groupe ayant étudié simultanément ces métabolismes dans le modèle lithium-pilocarpine d'ELT en spectroscopie RMN liquide (Melo et al., 2005) après 90 jours de crises récurrentes spontanées. Nos résultats suggèrent qu'aucune anomalie du métabolisme astrocytaire n'a pu être identifiée dans aucune des structures étudiées à partir du substrat spécifique à cette lignée cellulaire le [1,2- $^{13}\text{C}$ ]acétate. Ce premier résultat confirme les résultats rapportés par Melo et al. (2005) et indique qu'aucune modification à long terme n'est observable après 5 mois de crises récurrentes spontanées. L'étude de Hosoi et al. (2010) indique une importante augmentation de la captation de [ $^{14}\text{C}$ ]acétate (étude autoradiographique) dans les 2 heures suivant l'état de mal. Aussi les anomalies métaboliques astrocytaires suivies par ce substrat n'auraient cours qu'à la phase aigüe. Concernant le métabolisme neuronal nous ne rapportons pas de modification significative de [3- $^{13}\text{C}$ ]alanine. Cet isotopomère dérive du [3- $^{13}\text{C}$ ]pyruvate qui est transformé soit en [3- $^{13}\text{C}$ ]lactate par la lactate déshydrogénase soit en [3- $^{13}\text{C}$ ]alanine via l'alanine aminotransférase dans le cytosol et les mitochondries. Melo et al. (2005) rapportent une diminution significative de [3- $^{13}\text{C}$ ]alanine au sein de l'ensemble des structures cérébrales étudiées. Dans la mesure où 70% du [3- $^{13}\text{C}$ ]pyruvate dérivent du métabolisme du [1- $^{13}\text{C}$ ]glucose au sein des mitochondries neuronales (Haberg et Qu, 2000), ce résultat tend à indiquer une préservation de la première étape d'intégration du [3- $^{13}\text{C}$ ]pyruvate dans le cycle des acides tricarboxyliques. Notre

résultat apparaît cependant cohérent dans la mesure où l'alanine est synthétisée majoritairement dans les astrocytes (Westergaard et al., 1993 ; Sonnewald et al., 1993) au sein desquels nous n'avons pas constaté de modification métabolique majeure. Ce résultat peut par ailleurs être expliqué par le fait que les pertes neuronales dans le modèle lithium-pilocarpine ne sont pas forcément corrélées à l'hypométabolisme interictal (Dubé et al., 2001). Aucune anomalie de concentration en [4- $^{13}\text{C}$ ]glutamate n'a pu être observée ailleurs que dans le cortex entorhinal. Melo et al. (2005) rapportent une diminution de ce neurotransmetteur dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet. Des données collectées chez des patients rapportent l'augmentation de glutamate (Petroff et al., 2002a). Le glutamate est principalement synthétisé et stocké dans les neurones glutamatergiques (Ottersenn and Storm-Mathisen, 1985) puis libéré après dépolarisation/excitation et enfin recapté majoritairement par les transporteurs exprimés sur les membranes des astrocytes (Danbolt et al., 2001). Par la suite le glutamate est transformé en glutamine via la glutamine synthetase et transféré à nouveau aux neurones. Il s'agit du cycle glutamate/glutamine. Concernant la [4- $^{13}\text{C}$ ]glutamine, une diminution de concentration a pu être observée dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées dans le groupe li-pilo toutefois cette diminution était uniquement significative au sein du cortex entorhinal. Ce résultat pourrait suggérer une anomalie de transformation du glutamate en glutamine au sein des astrocytes. La glutamine synthetase est considérée comme l'enzyme clé de la régulation du cycle glutamate/glutamine, son inhibition provoquant des crises épileptiques (Shaw et al., 1999). Une diminution d'expression de cette enzyme a par ailleurs été rapportée chez des patients atteints d'ELT (Eid et al., 2004). De plus une diminution de ce métabolite a également été rapporté en SRMN in vivo (Van der Hel et al., 2011). Ces résultats au sein du cortex entorhinal complètent ainsi l'observation d'une diminution de concentration en myoinositol observée au sein de cette structure dans nos modèles PLS-DA. Notre équipe a rapporté par ailleurs que les modifications astrocytaires dans le modèle lithium-pilocarpine concernent davantage la taille des cellules (hypertrophie) sans modification de leur nombre (Roch et al., 2002b). Garzillo and Mello (2002) rapportent que seule la moitié des rats soumis à un état de mal épileptique induit par le lithium et la pilocarpine présentait des anomalies morphologiques des cellules astrocytaires. Ces éléments pourraient rendre compte de l'absence d'anomalie métabolique au sein de certaines structures et de l'absence de modification des concentrations en glutamine et en glutamate. En effet, ces éléments quantitatifs pourraient être déterminants compte-tenu de la faible sensibilité de la méthode. Par ailleurs, l'ensemble des études publiées ont uniquement rapporté les concentrations des isotopomères monomarqués par utilisation de séquences que l'on qualifie de « simple quanta ». Ces séquences offrent la possibilité de détecter l'ensemble des métabolites monomarqués toutefois comme indiqué sur la figure 20, de nombreux métabolites doublement



marqués sont synthétisés à partir du cycle des acides tricarboxyliques essentiellement au sein des astrocytes. Il serait ainsi indispensable d'envisager une analyse complète de l'ensemble des isotopomères issus du cycle des acides tricarboxyliques par l'intermédiaire de séquences double quanta. Ces séquences, dont la sensibilité est encore plus faible que les méthodes simple quanta, imposent d'avoir recours à de nouveaux développements méthodologiques tels que l'utilisation d'une cryosonde, une augmentation du champ magnétique ou encore une augmentation des quantités de substrats administrés. De telles expériences apparaissent indispensables à une meilleure compréhension des flux métaboliques au sein des astrocytes et des neurones. Concernant le GABA, on observe une diminution du  $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{GABA}$  et du  $[4\text{-}^{13}\text{C}]\text{GABA}$  dans tous les structures chez les rats li-pilo mais de façon non significative. Cette observation va dans le sens de l'étude de Van Der Hel et al. (2011).

**En conclusion de cette partie nous avons effectué les premières analyses métabolomiques du modèle d'ELT lithium-pilocarpine. Nos résultats suggèrent que le métabolome des rats li-pilo apparait différent de celui des rats li-NaCl pour au moins trois structures cérébrales après une période de 5 mois de crises récurrentes spontanées. Ainsi les anomalies métaboliques ne semblent pas se limiter à l'hippocampe et portent sur plusieurs métabolites. Une diminution de concentration en N-acétylaspartate semble systématique dans la majorité des structures étudiées, d'autres concentrations en métabolites comme les dérivés des cholines et le myoinositol apparaissent également perturbés. Les résultats de l'analyse des métabolismes neuronaux et astrocytaires à l'aide de substrats marqués au carbone 13 suggèrent que ces anomalies sont principalement confinées aux neurones. Cependant ce type d'investigation requiert des améliorations méthodologiques afin de définitivement valider ce résultat.**

## **EXPERIENCE 3 :**

**Caractérisation métabolomique par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS  
des tissus épileptogènes humains issus de la chirurgie**

### 3. Expérience 3 : Caractérisation métabolomique par RMN HRMAS (<sup>1</sup>H) des tissus épileptogènes humains issus de la chirurgie

#### 3.1 Objectifs

L'objectif de cette expérience est la caractérisation métabolomique des tissus cérébraux issus de la chirurgie de l'épilepsie sur une cohorte de 62 patients souffrant d'ELTM. Cet objectif comprend une analyse quantitative des concentrations en métabolites associé à une analyse multivariée des données intégrant des critères neuropathologiques et cliniques.

#### 3.2 Matériel et méthodes

##### 3.2.1 Caractéristiques des patients

Un total de 62 patients traités neurochirurgicalement pour une EPR ont été inclus dans l'étude après la signature d'un consentement éclairé. Cinquante sept patients ont été retenus pour l'analyse des données. Tous les patients ont subi un bilan préchirurgical extensif selon les recommandations en vigueur (évaluation clinique, neuropsychologique, vidéoélectroencéphalographie, imagerie (IRM ± TEP au <sup>18</sup>F-fluorodésoxyglucose). Dans la quasi-totalité des cas une approche par résection temporale en bloc complétée par une amygdalohippocampectomie a été effectuée. L'étiologie documentée dans les dossiers cliniques des patients était répartie de la manière suivante : épilepsie cryptogénique sans lésion ni anomalie visible à l'IRM (n=13), épilepsie avec sclérose de l'hippocampe sans autre anomalie visible à l'IRM (n=34), épilepsie associée à une tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale (TDN ; n=10), épilepsie associée à un gangliogliome (n=7). Le tableau 14 résume les caractéristiques des patients inclus.

**Tableau 14.** Caractéristiques des patients épileptiques pharmacorésistants inclus dans notre étude. CBZ : carbamazépine ; CLO : clobazam ; LEV : levetiracétam ; LTG : lamotrigine ; OXC : oxcarbamazépine ; PC : prise de contraste en IRM après injection de gadolinium ; SH : sclérose de l'hippocampe ; TOP : topiramate ; VAL : valproate de sodium ; VGB : vigabatrin.

3. EXPERIENCE 3 : Caractérisation métabolomique par RMN <sup>1</sup>H HRMAS des tissus épileptogènes humains

Sexe	Age	Age au début de l'épilepsie	Durée estimée de l'épilepsie	Traitement	Antécédent de convulsions	Fréquences estimées des crises (/mois)	IRM	Neuropathologie	EEG à 2 ans	Classif. Engel a 2 ans
F	35	11	20	CBZ, PHB	Oui		SH R	SH		
M	34	6	28	LEV, VAL, CLZ	Oui		SH G	SH		
F	9	7	4	LEV, PHB	Oui	2	SH G	SH	Normal	IA
M	9	8	31	CBZ, PHB	Oui	60	SH R	SH	Normal	IA
M	58	2	56	CBZ, LEV	Non	12	SH G	SH	Crises	IA
M	45	9	36	CLO, CBZ, LEV	Oui	8	SH G	SH	?	IA
F	26	7	19	LTG, CBZ, PGB,	Oui	45	SH G	SH	Normal	IA
M	56	48	8	LEV, LTG	Non	10	SH R	SH	Normal	IA
M	43	12	30	CBZ, TOP, LTG	Oui	4	SH G	SH	Normal	IA
F	26	5	21	CBZ	Oui	80	SH R	SH	Normal	IA
M	38	9	28	CBZ, LEV	Oui	3	SH G	SH	Normal	IA
M	19	10	9	LEV, LTG	Non	1	SH G	SH	Normal	?
M	15	2	14	TOP, MTG	Oui	2	SH R	SH	?	IB
M	35	18	17	LEV, OXC	Oui	1	SH R	SH	?	IA
M	36	17	19	TOP, LEV	Oui	3	SH G	SH	Normal	IA
M	48	6	42	CBZ, PHB, TOP	Oui	0 à 1	SH G	SH	Pointes	IA
M	39	5	34	OXC, TOP	Oui	0 à 1	SH G	SH	Pointes	IA
M	34	6	28	LEV, VAL, CLZ	Oui		SH G	SH		
M	38	9	21	CBZ, LEV	Oui	16	SH R	SH	Pointes	IA
M	32	10	21	OXC	Non	20	SH G	SH	Pointes	II
M	35	16	18	CBZ, LEV	Oui	plus de 10	SH G +	SH	?	IA
M	40	22	18	LTG, LEV	Oui	5 à 10	SH R	SH	Normal	?

3. EXPERIENCE 3 : Caractérisation métabolomique par RMN <sup>1</sup>H HRMAS des tissus épileptogènes humains

Sexe	Age	Age au début de l'épilepsie	Durée estimée de l'épilepsie	Traitement	Antécédent de convulsions	Fréquences estimées des crises (/mois)	IRM	Neuropathologie	EEG à 2 ans	Classif. Engel a 2 ans
F	9	7	4	LEV,PHB	Oui	2	SH G	SH	Normal	IA
M	31	10	21	CBZ, LEV	Non	?	SH G	SH	Normal	IA
F	14	4	12	TOP, LEV	Oui	3	SH G	SH	Normal	
M	44	1	43	CBZ, LEV	Oui	30	SH G +	SH	Normal	
F	37	12	25	LTG, LEV	Oui	8	SH G	SH	Normal	
M	43	25	18	LTG, LEV	Non	50 à 100	hypersignal	SH	Normal	
M	9	8	31	CBZ, PHB	Oui	60	SH R	SH	Normal	IA
M	38	2	36	CBZ, CLO	Non	12	SH G +	SH	Normal	
F	30	6	24	TOP, CBZ	Oui	15	SH R	SH	Normal	
M	58	2	56	CBZ, LEV	Non	12	SH G	SH	?	IA
F	41	3	38	CBZ, TOP	Oui	10	SH G +	SH	Normal	
M	42	12	30	CBZ, LEV	Oui	4	SH R	SH	Normal	
M	45	9	36	CLO, CBZ, LEV	Oui	8	Normal	Normal	?	IA
F	17	6	11	LEV, TOP	Oui	10	Normal	Normal	Pointes	IA
F	16	10	6	LEV, OXC	Oui	3	SH G	Normal	Normal	
M	32	18	15	LTG, LEV, VAL	Non	4	?	Normal	Crises	IA
M	26	17	8	LEV, LTG	Non	3	Normal	Normal	Normal	IA
F	30	28	2	TOP, LTG	Oui	8	Normal	Normal	Normal	IA
F	18	10	17	CLO, PHB, LTG	Non	15	Normal	Normal	?	
M	18	6	11	VAL, LTG	Non	?	Normal	Normal	Normal	
F	57	37	20	LTG	Non	120	Normal	Normal	Pointes	
M	43	20	23	OXC, LEV	Non	10	Normal	Normal	Normal	

3. EXPERIENCE 3 : Caractérisation métabolomique par RMN <sup>1</sup>H HRMAS des tissus épileptogènes humains

Sexe	Age	Age au début de l'épilepsie	Durée estimée de l'épilepsie	Traitement	Antécédent de convulsions	Fréquences estimées des crises (/mois)	IRM	Neuropathologie	EEG à 2 ans	Classif. Engel a 2 ans
M	32	18	15	LTG, LEV, VAL	Non	4	Normal	Normal	Crises	IA
M	39	21	18	OXC, VGB,	Non	5	Normal	Normal	Pointes	
M	54	33	15	OXC	Non	3	Normal	Normal	Normal	
F	25	12	13	OXC, LEV	Non	2	PC	TDN T3, T4	Normal	IA
M	45	22	23	LEV,VAL,LTG	Non	4	TDN	TDN T2	Normal	IA
M	30	18	12	TOP, LTG	18	2	TDN	TDN T1, T2	Normal	IA
M	22	15	7	TOP,	Non	12	TDN	TDN T4	Pointes	IB
M	52	15	37	CBZ, PGB, CLO	Non	12	TDN	TDN T1	Pointes	IA
F	18	10	7	LEV, LTG, TOP	Non	Sup à 30	HPC	TDN3	Crises	IB
F	26	21	5	LTG	Non	8	TDN	TDN T3	Normal	
F	20	13	7	?	?	30	?	TDN4	Normal	
M	59	25	34	LTG, LEV	Oui	6	hypersignal	TDN	Normal	
F	25	12	13	OXC, LEV	Non	2	PC T3	TDN T3, T4	Normal	IA
M	22	2	20	TOP, OXC	Oui	6	Anomalie	Gangliogliome	?	IA
F	6	4	2	LEV, OXC	non	12	Lésion	Gangliogliome	Pointes	?
F	9	8	1				PC	Gangliogliome	Normal	
F	14	6					PC	Gangliogliome	Normal	
F	27	2	25	TOP	Non	30	Lésion	Gangliogliome	Crises	
F	9	1	8	OXC, TOP	Non	4	kyste	Gangliogliome	Normal	
F	12	3					Lésion	Gangliogliome	Normal	
M	14	14	1				Lésion	Gangliogliome	Normal	

### 3.2.2 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques

Tous les patients ont été opérés sous anesthésie générale. L'exérèse s'est faite depuis les régions les plus temporales externes vers les structures mésiotemporales selon une technique de lobectomie temporale en bloc essentiellement en direction du pôle temporal (environ 4 cm sur 6 cm) suivie d'une amygdalohippocampectomie dont le volume était la plupart du temps de 3 à 4 cm<sup>3</sup> (Wendling et al., 2013). La congélation se faisait immédiatement après la résection par immersion dans l'azote liquide. Les structures retenues pour l'analyse ont été les suivantes : cortex temporal (T1 à T4), gyrus parahippocampique, amygdale et hippocampe. En routine, ces pièces opératoires sont destinées au service d'anatomie pathologique. Après cette analyse neuropathologique, les restes de matériels opératoires étaient préparés et placés dans les inserts pour analyse RMN <sup>1</sup>H HRMAS. La procédure de préparation suivait celle décrite pour l'expérience 1 (paragraphe 1.1 de ce chapitre).

### 3.2.3 Acquisition des spectres <sup>1</sup>H 1D RMN HRMAS

La méthodologie suit celle décrite dans l'expérience 1 (paragraphe 1.2.3 de la partie expérimentale).

### 3.2.4 Traitement des données et analyses statistiques

La méthodologie suit celle décrite dans l'expérience 1 (paragraphe 1.2.4 de la partie expérimentale) excepté l'application d'une analyse discriminante par régression aux moindres carrés partiel (PLS-DA) en lieu et place d'une analyse de type PCA. Les matrices d'analyses sont identiques.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Quantification des métabolites

Les résultats des quantifications moyennes pour chaque métabolite au sein de l'hippocampe sont rapportés dans le tableau 15 (en nmol.mg<sup>-1</sup>). Par rapport à un hippocampe sans sclérose, on observe une diminution significative de l'acétate, de l'alanine, du GABA, de la taurine, du N-acétylaspartate et de la valine au sein de l'hippocampe sclérotique.

Métabolite	HPC sans sclérose (n=13)	HPC avec sclérose (n=34)	HPC TDN (n=10)	HPC gangliogliome (n=8)
Acetate	0,20 ±0,05	0,17 ±0,05*	0,21 ±0,07	0,20 ±0,05
Alanine	0,52 ±0,12	0,39 ±0,12*	0,55 ±0,26#	0,47 ±0,12
Acide aspartique	0,72 ± 0,24	0,63 ±0,20	0,77 ±0,29	0,60 ±0,18
Ascorbate	0,48 ±0,16	0,40 ±0,16	0,44 ±0,19	0,60 ±0,27
Choline	0,31 ±0,13	0,25 ±0,06	0,33 ±0,12	0,28 ±0,08
Creatine	4,18 ±0,75	3,88 ±0,92	4,12 ±0,90	4,21 ±1,04
GABA	1,60 ±0,50	1,28 ±0,39*	1,30 ±0,51	1,18 ±0,25
Glucose	0,22 ±0,39	0,21 ±0,34	0,25 ±0,40	0,29 ±0,41
Gluthation	0,85 ±0,33	0,78 ±0,27	0,76 ±0,24	0,88 ±0,21
Glutamine	1,53 ±0,36	1,54 ±0,45	1,67 ±0,58	1,99 ±0,70*
Glutamate	4,39 ±0,08	4,09 ±1,01	4,27 ±1,10	3,71 ±0,99
Glycerophosphocholine	0,88 ±0,21	0,85 ±0,19	0,94 ±0,33	0,71 ±0,26
Glycine	1,86 ±0,55	1,55 ±0,56	1,70 ±0,31	1,65 ±0,44
Lactate	9,40 ±1,90	8,34 ±1,83	8,94 ±2,49	8,62 ±2,77
myo-inositol	6,91 ±1,87	7,07 ±2,29	7,20 ±2,51	8,32 ±3,72*
NAA	3,74 ±0,95	3,22 ±1,01	3,62 ±1,21	3,06 ±0,95
Phosphocholine	0,54 ±0,11	0,52 ±0,11	0,56 ±0,14	0,42 ±0,08
Phosphocreatine	0,19 ±0,11	0,18 ±0,08	0,21 ±0,66	0,17 ±0,07
Succinate	0,12 ±0,01	0,11 ±0,03	0,14 ±0,03	0,13 ±0,04*
Taurine	1,52 ±0,39	1,14 ±0,33*	1,26 ±0,27	1,32 ±0,41
Total Choline	1,83 ±0,32	1,71 ±0,30	1,93 ±0,49	1,47 ±0,31
Valine	0,06 ±0,03	0,03 ±0,03*	0,06 ±0,04	0,06 ±0,02

**Tableau 15.** Concentration moyenne des métabolites en nmol.mg<sup>-1</sup> dans l'hippocampe en fonction du groupe de patients. \* : différence statistiquement significative avec le groupe sans sclérose à p < 0,05. TDN : tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale.

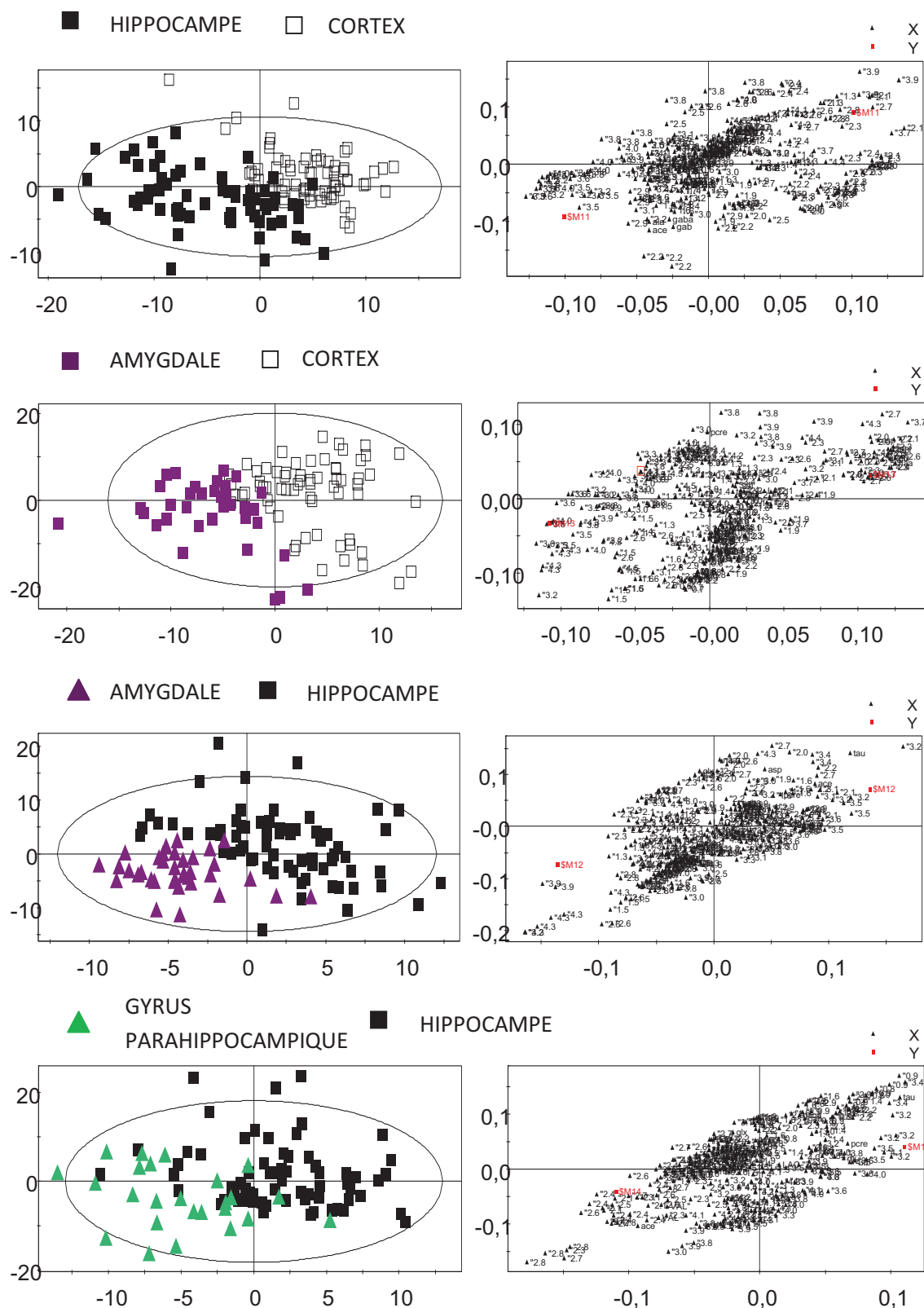


L'exploitation des données cliniques dans la formulation d'hypothèses clinico-métaboliques intégrant les mesures quantitatives des concentrations en métabolites d'intérêt n'ont pas permis d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. A titre d'exemple, la durée de la maladie épileptique ne semble pas être corrélée à la concentration en N-acétylaspartate ou en glutamate. Il en est de même de la fréquence des crises pour ces deux métabolites.

### 3.3.2 Analyse des données $^1\text{H}$ selon une analyse discriminante par la méthode de régression aux moindres carrés partiels (PLS-DA)

#### 3.3.2.1 Analyse par structure

La figure 34 représente les nuages de points issus de l'analyse PLS-DA par structure pour tous les patients confondus. Les résultats statistiques de chaque modèle sont reportés dans le tableau 16. L'intérêt de ces premières analyses indiquent que le métabolome de chaque structure semble être identifiable comparativement à une autre. Chaque modèle n'atteint pas le seuil de prédictibilité satisfaisante  $Q^2 = 0,5$  toutefois compte tenu du fait que tous les échantillons ont été mélangés indépendamment de la pathologie épileptique ces résultats apparaissent plutôt satisfaisants ( $Q^2 > 0,4$ ). Seul le métabolome issu du gyrus parahippocampique semble être peu différent de celui de l'hippocampe ( $Q^2 < 0,2$ ) et ce modèle ne peut être considéré comme satisfaisant. Ce premier résultat n'est pas directement en lien avec la problématique épileptique cependant ce type de résultat n'a encore jamais été rapporté dans la littérature. L'enseignement de ce résultat serait qu'une empreinte métabolomique pourrait être spécifique à chaque structure cérébrale.



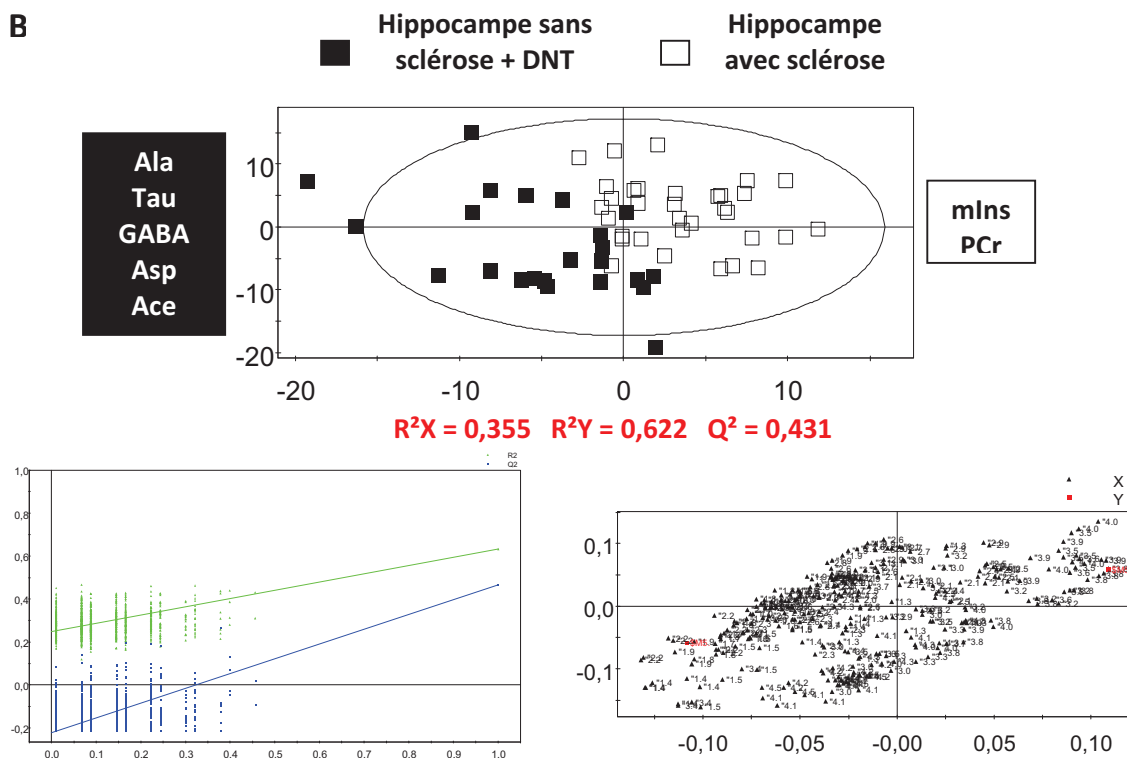
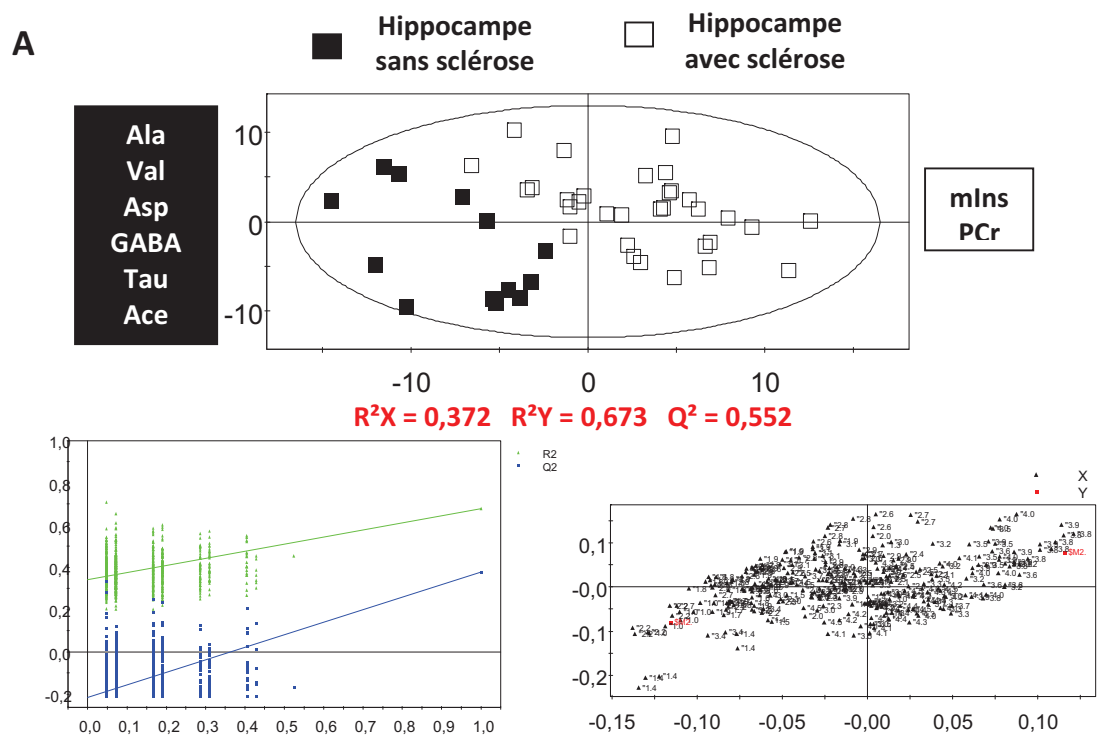
**Figure 34.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies cérébrales issues de patients épileptiques analysées par RMN  $^1\text{H}$  HRMAS en fonction des structures cérébrales analysées. Seules les deux premières composantes des modèles sont représentées. A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (Li-NaCl et Li-pilo).

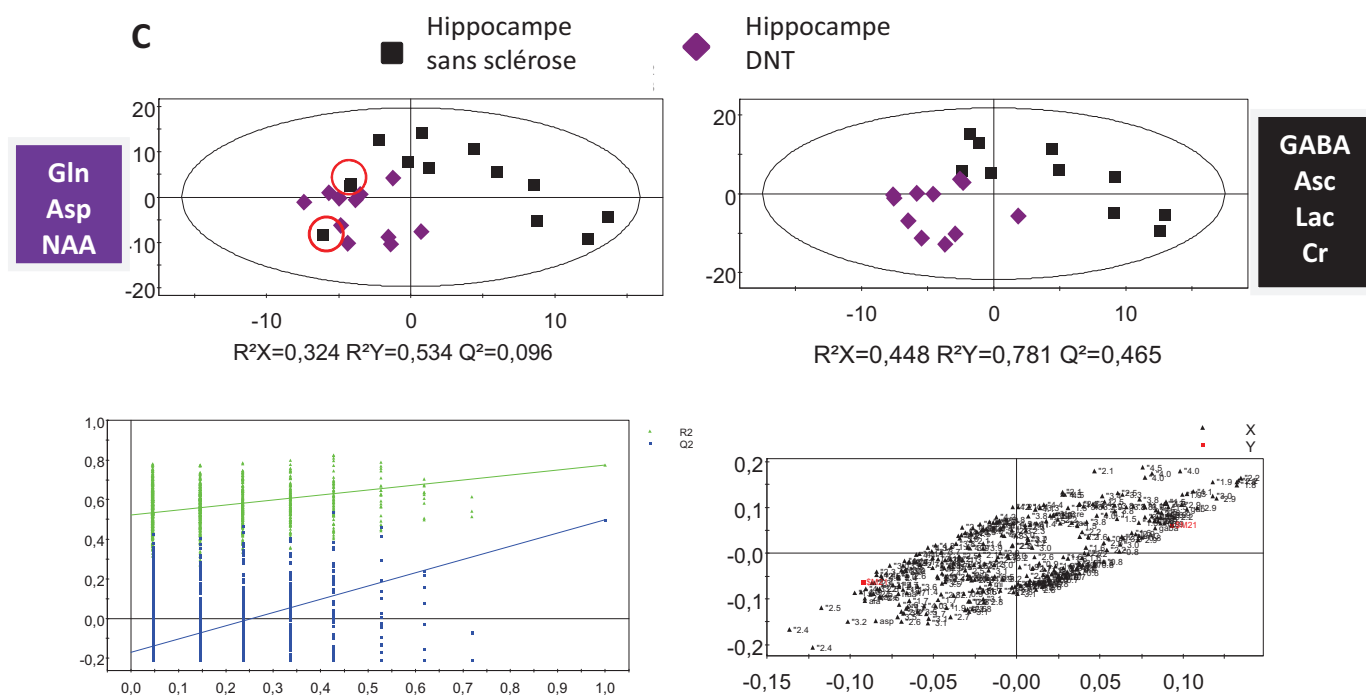
3. EXPERIENCE 3 : Caractérisation métabolomique par RMN <sup>1</sup>H HRMAS des tissus épileptogènes humains

Analyse	R <sup>2</sup> X	R <sup>2</sup> Y	Q <sup>2</sup>	Métabolites discriminants	Q <sup>2</sup> cumulatif maximum (nbr de composantes)
Cortex temporal vs hippocampe	0,256	0,635	0,485	Cortex temporal: Glu, Gln, Asp, NAA Hippocampe: Tau, mIns	0,569 (4)
Hippocampe vs Amygdale	0,223	0,603	0,436	Hippocampe : PCho/GPCho, Gln, Tau, Asp, Creat, NAA Amygdale : Glu, GABA	0,531 (3)
Amygdale vs cortex	0,386	0,55	0,454	Cortex : Asp, NAA, Glu, GABA Amygdale : mIns, Asc, Creat	0,454 (2)
Hippocampe vs gyrus parahippocampique	0,342	0,415	0,157	Hippocampe : Tau, PCho/GPCho, Glutha, mIns, GABA Parahippocampe : Asp, Glu, Gln, Succ	0,157 (2)

**Tableau 16.** Résultats statistiques des modèles PLS-DA confrontant à chaque fois deux types de structures cérébrales issues de l'ensemble des patients épileptiques inclus. Les valeurs R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y et Q<sup>2</sup> sont des indices de fiabilité du modèle compris entre 0 et 1 représentant respectivement le pourcentage de variance X (les métabolites) expliqué par le modèle, le pourcentage de variance Y (groupe de rats) expliqué par le modèle et l'indice de validation soit le pourcentage de variance X décrit par les deux premières composantes du modèle.

3.3.2.2 Analyse du tissu hippocampique





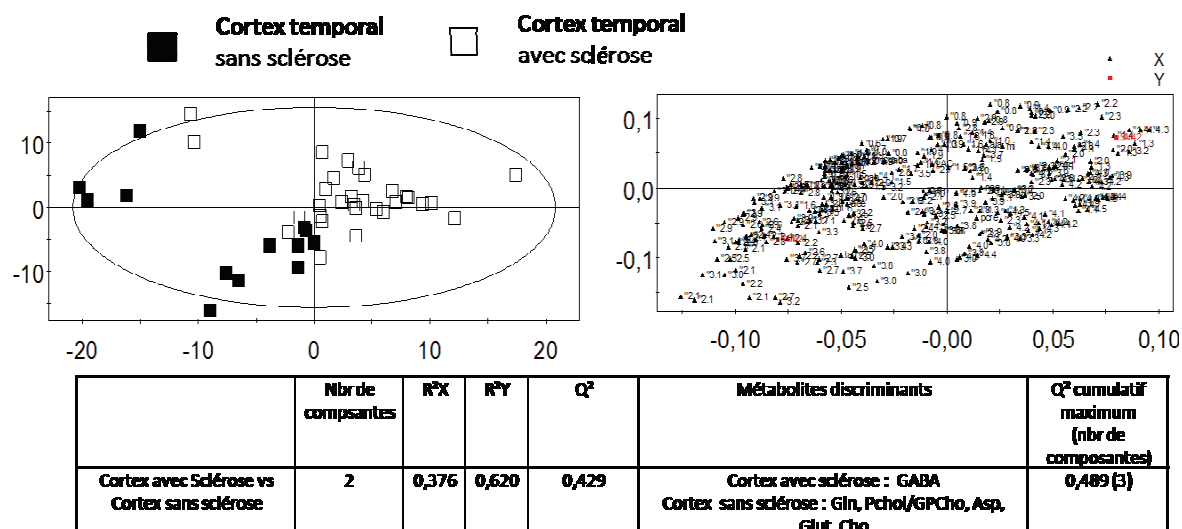
**Figure 35.** Représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres protons entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies d’hippocampes issues de patients épiléptiques analysées par RMN <sup>1</sup>H HRMAS en fonction de leurs caractéristiques histologiques : hippocampe sans sclérose, hippocampe avec sclérose et hippocampe sans sclérose issu de patients atteints de tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale (TDN) extramésiale. Pour chaque modèle : représentation des deux premières composantes selon une représentation de type « scatter plot », accompagnée d’une représentation de la validation de chaque modèle selon deux droites de régression suite à la permutation des échantillons selon leur classification (999 permutations) et d’une représentation de la répartition des variables X chaque point représente une variable issue des spectres acquis, les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes (« loading plot » en bas à droite). A : Hippocampe sans sclérose vs hippocampe avec sclérose. B : Hippocampes sans sclérose + DNT vs hippocampe avec sclérose. C : Hippocampe sans sclérose vs DNT.

On constate que l’analyse PLS-DA est en mesure de séparer les profils métaboliques des hippocampes sclérosés des hippocampes non sclérosés. Cette distinction porte sur 8 métabolites (figure 35, tableau 17). On note de suite que le glutamate et la glutamine ne semblent pas contribuer à distinguer ces deux groupes. Le GABA et le myoinositol semblent être discriminants respectivement pour les hippocampes sans sclérose et avec sclérose. L’ajout des échantillons d’hippocampes non sclérosés issus de patients atteints de tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale (TDN) extramésiale entraîne une légère diminution du score de discrimination mais ne modifie pas l’identité des métabolites discriminants. Ce résultat est rapporté du fait d’une relative faiblesse de l’effectif « hippocampe sans sclérose ». Toutefois la comparaison directe du profil métabolique des hippocampes sans sclérose des patients ne présentant aucune anomalie extramésiale en IRM aux hippocampes sans sclérose des patients atteints de TDN extramésiale suggère des différences certes

moins robustes mais relativement satisfaisantes. La figure du bas de la figure 35, rapporte deux modèles distincts pour cette comparaison. On constate qu'après une première analyse les résultats semblent non satisfaisants avec une valeur  $Q^2 < 0,1$ . La représentation graphique des différents échantillons montre toutefois clairement une mauvaise classification de deux échantillons, plutôt orientés vers le groupe hippocampe sans sclérose alors qu'ils sont étiquetés TDN. Une nouvelle analyse effectuée sans ces deux échantillons aboutit à une distinction satisfaisante des profils métaboliques des deux groupes ( $Q^2 = 0,465$ ). La question d'une mauvaise interprétation en imagerie des anomalies morphologiques observées se pose au même titre que celle de l'analyse neuropathologique. On remarque que pour cette nouvelle analyse d'autres métabolites semblent distinguer ces deux groupes par rapport à l'analyse précédente : la glutamine, l'aspartate et le N-acétylaspartate en faveur du groupe TDN ; le GABA, l'ascorbate, le lactate et la créatine en faveur du groupe sans sclérose. Ce résultat bien que difficile à interpréter est cependant indispensable à la compréhension de nos données par rapport à la littérature existante dans la mesure où la plupart des études en SRMN ont le plus souvent mélangé ces deux groupes dans leur analyse statistique. Enfin on observe que les profils métaboliques des hippocampes avec sclérose comparés aux hippocampes TDN ne semblent pas être distinguables par notre analyse statistique.

### 3.3.2.3 Analyse du cortex temporal

La figure 36 résume l'analyse multivariée PLS-DA. Malgré un résultat statistique à la limite de la validité ( $Q^2 = 0,429$ ) on observe une tendance à distinguer les cortex temporaux en fonction de l'histologie de l'hippocampe (avec et sans sclérose). De plus il semble que ce modèle met en valeur deux groupes bien distincts au sein du groupe cortex temporal sans sclérose. Nous n'avons malheureusement pas pu identifier de facteur pouvant rendre compte de cette distinction (âge, fréquence des crises, détails des comptes-rendus anatomopathologiques). Néanmoins la distinction cortex temporal avec sclérose de l'hippocampe vs cortex temporal sans sclérose de l'hippocampe suggère que le GABA apparaît discriminant en faveur du premier groupe. La glutamine, la phosphocholine, la glycérophosphocholine, l'aspartate, le glutathion et la choline semblent davantage associés au cortex temporal sans sclérose de l'hippocampe.



**Figure 36.** A gauche : représentation des modèles PLS-DA à partir des spectres entiers (0,5 à 4,6 ppm) des biopsies de cortex temporal de patients épileptiques analysées par RMN <sup>1</sup>H HRMAS en fonction du statut histologique de l'hippocampe (avec et sans sclérose). A droite : représentation de la répartition des variables X de chacun des modèles selon les deux premières composantes. Chaque point représente une variable issue des spectres acquis. Les deux points rouges indiquent les barycentres de chacun des groupes. Le tableau résume les caractéristiques statistiques du modèle et les métabolites discriminants.

### 3.4 Discussion

Nous rapportons ici les premières analyses multivariées appliquées à l'étude du métabolome de tissus épileptogènes humains par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H HRMAS. Le premier résultat majeur de notre étude est l'identification de deux empreintes métabolomiques distinctes entre hippocampe sclérosé et hippocampe non sclérosé. Parmi les métabolites discriminants identifiés, le myoinositol et la phosphocréatine apparaissent en faveur de l'hippocampe sclérosé tandis que la valine, l'alanine, le GABA, la taurine, l'acétate et l'aspartate apparaissent en faveur de l'hippocampe non sclérosé. Lors de notre analyse quantitative deux à deux des concentrations en métabolites de chacun des groupes, seuls le GABA, la taurine, l'acétate, la valine et l'alanine semblaient statistiquement significatifs. Le recouvrement partiel de ces résultats illustre la différence de méthodologie statistique employée. L'approche statistique de comparaison des moyennes ayant pour démarche d'isoler chacun des métabolites un à un alors que l'analyse PLS-DA tient compte de l'ensemble des variances associées à l'ensemble des signaux mesurés. Il faut noter que la totalité des études de spectroscopie publiées à ce jour ne se sont appuyées que sur une analyse de moyennes et/ou de corrélation (SRMN *in vivo* et *in vitro* de patients atteints d'ELT). A titre d'exemple la concentration en myoinositol dans l'hippocampe sclérosé a été rapportée de manière inconstante. Woermann et al. (1998) ont rapporté en SRMN *in vivo* que l'index Myoinositol/NAA était diminué chez les patients atteints d'ELT avec et sans sclérose. Pelling et al. (1993) rapporte que le myoinositol est augmenté au sein du cortex

cérébral des patients atteints d'ELT indépendamment de l'histologie de l'hippocampe. Aasly et al. (1999) en SRMN *ex vivo* ne rapportent aucune modification dans les cas de gliose de l'hippocampe mais sur un effectif restreint (<10). Dans la mesure où nous avons retrouvés ce métabolite comme discriminant au sein des cortex temporaux de patients ayant une sclérose de l'hippocampe et de l'hippocampe sclérosé lui-même, qu'il est synthétisé par les astrocytes, que des anomalies histologiques et électrophysiologiques de ce type cellulaire ont été rapportées non seulement au sein de l'hippocampe mais également dans les aires corticales de patients épileptiques (pour revue Steinhäuser et al., 2012 ; Wetherington et al., 2008), l'ensemble de ces données plaident en faveur d'une anomalie métabolique en lien avec cet effecteur. Chez l'animal il a été rapporté que des souris KO pour le gène du transporteur du myoinositol présente une hypersensibilité à la pilocarpine conduisant à des états de mal épileptiques rapides sans traitement préalable par le lithium (Belmaker et aBersudsky, 2007). Rappelons que dans notre étude du modèle d'ELT li-pilo, le myoinositol apparaissait comme discriminant dans les cortex entorhinal et cérébraux. Dans la mesure où le myoinositol dérive de la famille des inositol pyrophosphates impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires et plus particulièrement dans la régulation de la production d'ATP, tout comme la phosphocréatine (discriminante en faveur de l'hippocampe sclérosé), un abord neurométabolique de la pathologie épileptique reste pertinent.

Un autre résultat important est l'absence de différence significative de concentration en N-acétylaspartate dans les hippocampes avec et sans sclérose. Ce métabolite ne contribue pas par ailleurs à discriminer les deux groupes lors de notre analyse PLS-DA. L'observation d'une diminution de NAA au sein de l'hippocampe de patients épileptiques a été rapportée pour la première fois par van Gelder et al. (1972). Cette diminution a été rapportée dans la majorité des études SRMN *in vivo* bien qu'une étude récente nuance fortement cette observation indiquant notamment que la concentration en NAA présentait de fortes variations interindividuelles (Mueller et al., 2011 ; cf tableau 6, chapitre 1 paragraphe 6.3.3). Par ailleurs, il a été montré que les concentrations en NAA sont plus importantes dans la partie antérieure de l'hippocampe à la fois chez les sujets contrôles et chez les patients épileptiques (Simister et al., 2002 ; Vermathen et al., 2000). Une étude relativement récente en SRMN *ex vivo* indique que ce déficit en NAA chez les patients épileptiques n'est pas en rapport avec les pertes neuronales et est confinée à la sous-région CA3 de l'hippocampe (Vielhaber et al., 2008). Pour des raisons méthodologiques et pratiques nous n'avons pas été en mesure d'effectuer des microdissections de la région hippocampique des patients épileptiques privilégiant d'avantage le nombre d'échantillon analysés par RMN <sup>1</sup>H HRMAS. Ces éléments pourraient être à l'origine du manque de significativité de nos résultats.



Concernant le GABA, neuromédiateur inhibiteur central dans la pathologie épileptique, nous observons sa diminution significative dans l'hippocampe sclérosé. Il apparaissait par ailleurs comme un métabolite discriminant entre hippocampe sclérosé et non sclérosé. Ce résultat avait déjà été observé par van Gelder et al. (1972) chez les patients épileptiques. Dans une étude en SRMN *ex vivo* Petroff et al. (2002a) faisait part d'une absence de différence entre hippocampe sclérosé et hippocampe normal. Peu d'études en SRMN *in vivo* ont étudié ce métabolite essentiellement pour des raisons techniques de résolution spectrale (le signal associé au GABA étant un multiplet). Toutefois Simister et al. (2009) indiquent que le rapport GABA/Cr n'est pas significativement différent au sein de l'hippocampe sclérosé en comparaison des sujets témoins. Ce même métabolite s'est avéré discriminant en faveur du cortex cérébral de patients atteints de sclérose de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent un déséquilibre GABAergique entre hippocampe sclérosé et cortex cérébral.

Précisons que notre travail comporte un certain nombre de limitations essentiellement d'ordre méthodologique. Tout d'abord les patients épileptiques étaient tous sous traitement antiépileptique au moment de l'intervention chirurgicale. Le type de traitement pourrait être pris en compte par constitution de groupes spécifiques de patients toutefois au détriment d'effectifs restreints. Au prix d'une légère augmentation d'effectif une telle approche pourrait être envisagée dans le groupe sclérose. Toutefois notons bien que les patients inclus souffraient tous d'une épilepsie pharmacorésistante non équilibrée par traitement médicamenteux. En conséquence les déséquilibres métaboliques potentiels liés à l'origine et/ou la manifestation de crises épileptiques ne seraient pas corrigés. Néanmoins un impact sur les concentrations des différents métabolites et neurotransmetteurs ne peut être écarté. Un autre biais méthodologique important est l'impossibilité d'effectuer nos comparaisons sur des tissus corticaux ou hippocampiques sains. L'âge variable des patients peut également être un facteur confondant pour l'interprétation de nos données. De plus, une dimension neurohistologique fait défaut à notre étude. L'étude de l'expression de protéines décrites comme perturbées dans la pathologie épileptique telle que les transporteurs du glutamate, les canaux de type aquaporine ou Kir4.1, les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques (glutamine synthétase notamment), les enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire (aconitase notamment) contribueraient à une meilleure compréhension de nos résultats. L'ensemble de ces analyses est envisagé sur le matériel biologique des patients encore disponible. Enfin, l'information issue d'un génotypage des patients serait sans nul doute un apport majeur.

**En conclusion, nous avons pour la première fois en RMN <sup>1</sup>H HRMAS décrit le métabolome de tissus épileptogènes issus de patients atteints d'ELT sur plus de 200 échantillons. Notre analyse métabolomique a permis d'établir une distinction entre hippocampe sclérosé et hippocampe non**

sclérosé. Parmi les métabolites discriminants ces deux groupes le myoinositol apparaît d'avantage associé au premier groupe et le GABA au second. Le GABA semble par ailleurs discriminer les cortex temporaux de ces deux groupes. En revanche les hypothèses clinico-métaboliques testées sur la base des données d'anamnèse des patients du type fréquence des crises, durée de la maladie, antécédent de convulsions fébriles n'ont pas permis de distinguer des profils métaboliques distincts. Cette base de données devra être réinterprétée à la lumière de données complémentaires de types neurohistologique ou génétique.

## 4. Discussion générale et perspectives

Tout d'abord notre travail sur l'évaluation des méthodes de fixation du métabolisme cérébral est apparu comme un point méthodologique central pour la suite de nos travaux. Notre protocole expérimental chez l'animal nous a permis de valider nos méthodes de recueil des pièces opératoires humaines. La labilité des métabolites étudiés par la suite dans nos travaux a pu être évaluée à deux niveaux. Tout d'abord au moment du prélèvement des tissus cérébraux (fixation *in vivo* à l'aide de microondes pulsées et congélation immédiate dans l'azote liquide). Des différences significatives sont apparues pour 11 métabolites. Des différences de concentrations comprises entre une et cinq fois la valeur d'un groupe ont été observées (notamment pour le lactate et la phosphocréatine). Ces identifications nous ont permis de mieux aborder l'interprétation des analyses RMN HRMAS réalisées sur les tissus cérébraux des patients atteints d'ELT. Amorcer la discussion d'une hypothèse physiopathologique de la l'ELT sur la base de modifications de concentration en métabolites labiles pourra être évité. Le second niveau a été les modifications observées *in situ* au cours des acquisitions RMN. Il semble que des modifications biochimiques ont cours pendant l'acquisition des spectres. Nos travaux ont montré que pour des durées relativement courtes (inférieure à l'heure) les modifications de concentrations en métabolites sont mineures (3 métabolites sur 16). Toutefois pour des durées d'acquisitions plus longues la méthode de fixation par microondes pulsées offre une stabilité de signaux sur des durées de 15 heures suggérant l'absence de modifications biochimiques au sein de l'échantillon. Il s'agit là d'un avantage méthodologique insoupçonné au moment d'initier ces travaux. Cette découverte, confirmée depuis par une autre étude (Davila et al. 2012), justifie à elle seule de mener une réflexion sur le recours systématique à une irradiation par microondes pulsées pour toute biopsie analysée par HMRAS et pour lesquelles des durées d'acquisitions importantes sont nécessaires (typiquement de quelques heures : acquisition 2D, acquisition  $^{13}\text{C}$  par exemple). Dans ce but le développement d'un dispositif dédié aux biopsies reste à élaborer. Cette démarche nécessitera de définir de nombreux paramètres adaptés aux biopsies : la puissance (en Watt), la fréquence (en GHz), l'efficacité du magnétron pour l'émission des microondes (de l'ordre de la seconde). Par ailleurs, il existe des dispositifs pour le traitement de tumeurs par microondes pulsées. Il s'agit d'ablation mini-invasive utilisant la chaleur (élevée et transitoire) délivrée par les microondes pour obtenir la destruction d'un tissu cancéreux. Ces dispositifs sont déjà utilisés en cliniques. Il serait utile de pouvoir analyser et comparer, par RMN HRMAS, des échantillons biologiques humains issus d'une

ablation par microondes pulsées à ceux de protocole de résection standard suivi d'une congélation immédiate dans l'azote liquide.

A propos de la caractérisation métabolomique des tissus cérébraux dans le modèle lithium-pilocarpine. Un premier enseignement suggère que les résultats observés à partir des spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ne présentent pas de différences majeures par rapport aux travaux réalisés en RMN liquide (Mello et al., 2005 ; sans analyse multivariée). Ce résultat est important. Il indique que la RMN HRMAS à haute résolution en est mesure de fournir des données comparable à la RMN liquide tout en s'affranchissant des étapes d'extraction des métabolites. Ce travail confirme les résultats similaires rapportés par Risa et al. (2008) sur les comparaisons RMN HRMAS et RMN liquide. Par ailleurs, nos analyses multivariées de types PLS-DA ont permis d'identifier des profils métaboliques distincts pour au moins deux structures clés dans la circuiterie épileptique à savoir l'hippocampe et le cortex entorhinal. Pour ces deux structures le NAA, diminué significativement dans le groupe Li-pilo, a été retrouvé comme un métabolite discriminant. Des résultats identiques concernant la diminution de NAA dans ces deux structures ont été rapportés par Mello et al. (2005). Ainsi ces résultats renforcent la pertinence de l'analyse multivariée. Un autre exemple à propos de l'aspartate illustre l'intérêt de l'analyse multivariée. Une diminution d'aspartate a été rapportée par Melo et al. (2005) dans l'hippocampe des rats Li-pilo. Nous observons une légère diminution non significative dans ce même groupe. Cependant l'analyse PLS-DA indique que l'aspartate est un métabolite discriminant lors de la comparaison de cette structure entre les deux groupes. Ainsi du fait d'un nombre d'échantillons relativement faible et de variations interéchantillons importantes, il semble que la combinaison d'une analyse de type test t couplée à une analyse de type multivariée participe à une meilleure caractérisation métabolique du modèle. Plusieurs autres exemples de ce type ont été observés dans nos travaux (aspartate dans le cortex, glutamine dans l'hippocampe, GABA et myoinositol dans le cortex entorhinal). Ainsi il semble intéressant de mettre à profit ce type d'approche pour des expériences complémentaires. Plusieurs pistes peuvent être explorées par exemple corrélérer le métabolome de chacune des structures cérébrales à des enregistrements intracérébraux ou encore évaluer l'effet d'une thérapeutique antiépileptique sur le métabolome observé par RMN HRMAS. Par ailleurs évaluer le métabolome de rats lithium-pilocarpine à différentes âges d'induction de l'état de mal permettrait également une meilleure compréhension de la dynamique métabolique du modèle. Enfin le recours à l'IRM pour l'évaluation du métabolome de structures cérébrales présentant des hypersignaux au cours de la mise en place de la circuiterie épileptique contribuerait également à une meilleure compréhension métabolique du déroulement temporel de mise en place de cette circuiterie épileptique.

La confrontation des données métabolomiques issues du modèle lithium-pilocarpine à celles issues des tissus cérébraux des patients atteints d'ELT est plus délicate pour des raisons essentiellement méthodologiques. Dans le cas de notre expérience chez l'animal nous avons pu comparer directement des tissus cérébraux sains à des tissus cérébraux de rats Li-pilo alors que pour l'homme nous avons essentiellement comparé des tissus de patients ELT entre eux sur la base de critères histopathologiques. Les analyses statistiques semblent moins robustes dans l'analyse des tissus des patients comparativement aux résultats observés dans le modèle Li-pilo. Toutefois les données issues des patients montrent des résultats importants. Le GABA est un métabolite significativement diminué et discriminant dans l'hippocampe des patients atteints de sclérose, il en est de même de la taurine. Le myoinositol est augmenté, il s'agit d'un métabolite discriminant en faveur de l'hippocampe sclérosé. Un autre résultat important est que le GABA semble être augmenté et discriminant dans le cortex des patients ELT avec sclérose comparée aux patients sans sclérose. Cependant les hypothèses clinico-métaboliques se sont montrées infructueuses. Ce résultat peut être expliqué de différentes manières. Les modèles que nous avons testés ont uniquement intégré des données cliniques qualitatives (durée de la maladie, fréquence des crises, antécédent de convulsions) dont la fiabilité n'est pas robuste. Par ailleurs il est possible que la classification opérée sur la base de l'analyse histopathologique et de l'imagerie morphologique doive intégrer des critères supplémentaires : temps de relaxation dans l'hippocampe, évaluation poussée de la morphologie du pôle temporal (i.e. blurring), comptage cellulaire dans l', indice de sclérose et marqueurs histologiques sont des données qui pourront être intégrées aux hypothèses testées.

Enfin l'enjeu des données issues de la biologie des systèmes et le recours à des statistiques complexes. Il serait être intéressant de construire des modèles associant des critères de pondérations aux différentes données issues des patients. En effet nous n'avons pu former de groupes homogènes de patients d'un point de vue de leur âge, de la durée de la maladie, des fréquences des crises ou encore du degré d'atteinte hippocampique. Ces pondérations pourraient être un moyen de corriger cette hétérogénéité. Ainsi ce travail de thèse a abordé de manière translationnelle la pathologie épileptique sous l'angle de la biologie des systèmes à l'aide d'une méthode innovante d'analyse des tissus biologiques. Celui-ci s'est essentiellement placé à un niveau descriptif compte tenu de l'absence de données comparables pour cette pathologie dans la littérature. La valorisation de ce travail en termes de compréhension physiopathologique de l'épilepsie temporale pharmacorésistante devra intégrer des modes d'analyses et de représentation adaptées. Ce dernier point reste en cours de réalisation et illustre l'approche translationnelle appliquée à la médecine imposant la mobilisation de ressources complémentaires : médicale, chirurgicale, analytique et statistique.

## REFERENCES

## REFERENCES

- Aasly, J.; Silfvenius, H.; Aas, T.C.; Sonnewald, U.; Olivecrona, M.; Juul, R.; and White, L.R. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain biopsies from patients with intractable epilepsy. *Epilepsy Res*, 35(3):211-7, 1999.
- Agarwal, N., and Renshaw, P.F. Proton MR spectroscopy-detectable major neurotransmitters of the brain: biology and possible clinical applications. *AJNR Am J Neuroradiol*, 33(4):595-602, 2012.
- Agnolet, S.; Wiese, S.; Verpoorte, R.; and Staerk, D. Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform: combined use of metabolomics, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay. *J Chromatogr A*, 1262:130-7, 2012.
- Akoka, S.; Barantin, L.; and Trierweiler, M. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Anal Chem*, 71(13):2554-7, 1999.
- Al Zweiri, M.; Sills, G.J.; Leach, J.P.; Brodie, M.J.; Robertson, C.; Watson, D.G.; and Parkinson, J.A. Response to drug treatment in newly diagnosed epilepsy: a pilot study of (1)H NMR- and MS-based metabolomic analysis. *Epilepsy Res*, 88(2-3):189-95, 2010.
- Alheid, G.F. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, 985:185-205, 2003.
- Aliashkevich, A.F.; Yilmazer-Hanke, D.; Van Roost, D.; Mundhenk, B.; Schramm, J.; and Blumcke, I. Cellular pathology of amygdala neurons in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol*, 106(2):99-106, 2003.
- Alvarez, G.; Munoz-Montano, J.R.; Satrustegui, J.; Avila, J.; Bogonez, E.; and Diaz-Nido, J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett*, 453(3):260-4., 1999.
- Andrew R.; Newing R. A. The narrowing of nuclear magnetic resonance spectra by molecular rotation in solids. *Proc. Phys. Soc.* 72 959, 1958.
- Annegers, J.F.; Hauser, W.A.; and Elveback, L.R. Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia*, 20(6):729-37, 1979.
- Arruda, F.; Cendes, F.; Andermann, F.; Dubeau, F.; Villemure, J.G.; Jones-Gotman, M.; Poulin, N.; Arnold, D.L.; and Olivier, A. Mesial atrophy and outcome after amygdalohippocampectomy or temporal lobe removal. *Ann Neurol*, 40(3):446-50, 1996.
- Aull-Watschinger, S.; Pataraiia, E.; Czech, T.; and Baumgartner, C. Outcome predictors for surgical treatment of temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, 49(8):1308-16, 2008.
- Aue, W.P.; Bartholdi, E.; Ernst, R.R. Two-dimensional spectroscopy: application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* 64, 17, 1976.
- Avoli, M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. *Epilepsia*, 37(11):1035-42., 1996.
- Bartolomei, F.; Chauvel, P.; and Wendling, F. Epileptogenicity of brain structures in human temporal lobe epilepsy: a quantified study from intracerebral EEG. *Brain*, 131(Pt 7):1818-30, 2008.
- Bartolomei, F.; Khalil, M.; Wendling, F.; Sontheimer, A.; Regis, J.; Ranjeva, J.P.; Guye, M.; and Chauvel, P. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia*, 46(5):677-87, 2005.
- Bates, T.E.; Strangward, M.; Keelan, J.; Davey, G.P.; Munro, P.M.; and Clark, J.B. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for 1H MRS studies in vivo. *Neuroreport*, 7(8):1397-400, 1996.
- Bax, A.; and Davis, D.G. 1985. *J. Magn. Reson.* 65, 1985.
- Behar, K.L.; den Hollander, J.A.; Stromski, M.E.; Ogino, T.; Shulman, R.G.; Petroff, O.A.; and Prichard, J.W. High-resolution 1H nuclear magnetic resonance study of cerebral hypoxia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(16):4945-8, 1983.
- Bellemann, M.E., and Brix, G. NMR studies of brain 13C-glucose uptake and metabolism: present status. *Magn Reson Imaging*, 15(8):997-1003, 1997.

- Belmaker, R.H., and Bersudsky, Y. Lithium-pilocarpine seizures as a model for lithium action in mania. *Neurosci Biobehav Rev*, 31(6):843-9, 2007.
- Ben-Ari, Y., and Holmes, G.L. The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 18(2):141-5, 2005.
- Benhamed M., La métabolomique par la spectroscopie RMN HRMAS dans le cadre de l'évaluation de la qualité du greffon pour la transplantation pulmonaire. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg. 2011.
- Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; Moshe, S.L.; Nordli, D.; Plouin, P.; and Scheffer, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4):676-85, 2010.
- Bernasconi, A. Magnetic resonance imaging in intractable epilepsy: focus on structural image analysis. *Adv Neurol*, 97:273-8, 2006.
- Bernasconi, A.; Tasch, E.; Cendes, F.; Li, L.M.; and Arnold, D.L. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging suggests progressive neuronal damage in human temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res*, 135:297-304, 2002.
- Bernasconi, N.; Bernasconi, A.; Andermann, F.; Dubeau, F.; Feindel, W.; and Reutens, D.C. Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI study. *Neurology*, 52(9):1870-6, 1999.
- Bernasconi, N.; Kinay, D.; Andermann, F.; Antel, S.; and Bernasconi, A. Analysis of shape and positioning of the hippocampal formation: an MRI study in patients with partial epilepsy and healthy controls. *Brain*, 128(Pt 10):2442-52, 2005.
- Bertram, E.H.; Mangan, P.S.; Zhang, D.; Scott, C.A.; and Williamson, J.M. The midline thalamus: alterations and a potential role in limbic epilepsy. *Epilepsia*, 42(8):967-78, 2001.
- Bettus, G.; Guedj, E.; Joyeux, F.; Confort-Gouny, S.; Soulier, E.; Laguitton, V.; Cozzone, P.J.; Chauvel, P.; Ranjeva, J.P.; Bartolomei, F.; and Guye, M. Decreased basal fMRI functional connectivity in epileptogenic networks and contralateral compensatory mechanisms. *Hum Brain Mapp*, 30(5):1580-91, 2009.
- Bien, C.G.; Raabe, A.L.; Schramm, J.; Becker, A.; Urbach, H.; and Elger, C.E. Trends in presurgical evaluation and surgical treatment of epilepsy at one centre from 1988-2009. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(1):54-61, 2013.
- Bijur, G.N.; De Sarno, P.; and Jope, R.S. Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem*, 275(11):7583-90., 2000.
- Binder, D.K., and Steinhauser, C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia*, 54(5):358-68, 2006.
- Birkemeyer, C.; Luedemann, A.; Wagner, C.; Erban, A.; and Kopka, J. Metabolome analysis: the potential of in vivo labeling with stable isotopes for metabolite profiling. *Trends Biotechnol*, 23(1):28-33, 2005.
- Blanc, F.; Martinian, L.; Liagkouras, I.; Catarino, C.; Sisodiya, S.M.; and Thom, M. Investigation of widespread neocortical pathology associated with hippocampal sclerosis in epilepsy: a postmortem study. *Epilepsia*, 52(1):10-21, 2011.
- Blasco, H.; Corcia, P.; Moreau, C.; Veau, S.; Fournier, C.; Vourc'h, P.; Emond, P.; Gordon, P.; Pradat, P.F.; Praline, J.; Devos, D.; Nadal-Desbarats, L.; and Andres, C.R. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 5(10):e13223, 2010.
- Blumcke, I.; Cross, J.H.; and Spreafico, R. The international consensus classification for hippocampal sclerosis: an important step towards accurate prognosis. *Lancet Neurol*, 12(9):844-6, 2013.
- Blumcke, I.; Lobach, M.; Wolf, H.K.; and Wiestler, O.D. Evidence for developmental precursor lesions in epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Microsc Res Tech*, 46(1):53-8, 1999.
- Blumcke, I.; Pauli, E.; Clusmann, H.; Schramm, J.; Becker, A.; Elger, C.; Merschhemke, M.; Meencke, H.J.; Lehmann, T.; von Deimling, A.; Scheiwe, C.; Zentner, J.; Volk, B.; Romstock, J.; Stefan, H.; and Hildebrandt, M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol*, 113(3):235-44, 2007.



- Blumcke, I., and Spreafico, R. Cause matters: a neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathol*, 22(3):347-9, 2012.
- Blumcke, I.; Thom, M.; Aronica, E.; Armstrong, D.D.; Bartolomei, F.; Bernasconi, A.; Bernasconi, N.; Bien, C.G.; Cendes, F.; Coras, R.; Cross, J.H.; Jacques, T.S.; Kahane, P.; Mathern, G.W.; Miyata, H.; Moshe, S.L.; Oz, B.; Ozkara, C.; Perucca, E.; Sisodiya, S.; Wiebe, S.; and Spreafico, R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 54(7):1315-29, 2013.
- Blumcke, I.; Thom, M.; Aronica, E.; Armstrong, D.D.; Vinters, H.V.; Palmmini, A.; Jacques, T.S.; Avanzini, G.; Barkovich, A.J.; Battaglia, G.; Becker, A.; Cepeda, C.; Cendes, F.; Colombo, N.; Crino, P.; Cross, J.H.; Delalande, O.; Dubeau, F.; Duncan, J.; Guerrini, R.; Kahane, P.; Mathern, G.; Najm, I.; Ozkara, C.; Raybaud, C.; Represa, A.; Roper, S.N.; Salamon, N.; Schulze-Bonhage, A.; Tassi, L.; Vezzani, A.; and Spreafico, R. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*, 52(1):158-74, 2011.
- Blumcke, I., and Wiestler, O.D. Gangliogliomas: an intriguing tumor entity associated with focal epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(7):575-84, 2002.
- Bodenhausen, G.; Ruben, D.G. *Chem. Phys. Lett.* 69, 1980.
- Bonilha, L.; Edwards, J.C.; Kinsman, S.L.; Morgan, P.S.; Fridriksson, J.; Rorden, C.; Rumboldt, Z.; Roberts, D.R.; Eckert, M.A.; and Halford, J.J. Extrahippocampal gray matter loss and hippocampal deafferentation in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 51(4):519-28, 2010a.
- Bonilha, L.; Elm, J.J.; Edwards, J.C.; Morgan, P.S.; Hicks, C.; Lozar, C.; Rumboldt, Z.; Roberts, D.R.; Rorden, C.; and Eckert, M.A. How common is brain atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*, 51(9):1774-9, 2010b.
- Bonilha, L.; Kobayashi, E.; Rorden, C.; Cendes, F.; and Li, L.M. Medial temporal lobe atrophy in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(12):1627-30, 2003.
- Bonilha, L.; Nesland, T.; Martz, G.U.; Joseph, J.E.; Spampinato, M.V.; Edwards, J.C.; and Tabesh, A. Medial temporal lobe epilepsy is associated with neuronal fibre loss and paradoxical increase in structural connectivity of limbic structures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(9):903-9, 2012.
- Bonilha, L.; Rorden, C.; Halford, J.J.; Eckert, M.; Appenzeller, S.; Cendes, F.; and Li, L.M. Asymmetrical extra-hippocampal grey matter loss related to hippocampal atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78(3):286-94, 2007.
- Bottomley, P.A. Noninvasive study of high-energy phosphate metabolism in human heart by depth-resolved <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Science*, 229(4715):769-72, 1985.
- Brandt, C.; Ebert, U.; and Loscher, W. Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res*, 62(2-3):135-56, 2004.
- Breitmaier E., Voelter W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. VCH Weinheim, 1989.
- Brazdil, M.; Marecek, R.; Fojtikova, D.; Mikl, M.; Kuba, R.; Krupa, P.; and Rektor, I. Correlation study of optimized voxel-based morphometry and (1)H MRS in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Hum Brain Mapp*, 30(4):1226-35, 2009.
- Broicher, S.D.; Frings, L.; Huppertz, H.J.; Grunwald, T.; Kurthen, M.; Kramer, G.; and Jokeit, H. Alterations in functional connectivity of the amygdala in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurol*, 259(12):2546-54, 2012.
- Brown, F.F.; Campbell, I.D.; Kuchel, P.W.; and Rabenstein, D.C. Human erythrocyte metabolism studies by 1H spin echo NMR. *FEBS Lett*, 82(1):12-6, 1977.
- Brutton C.J. *Temporal lobe epilepsy; Epilepsy, Temporal Lobe; Temporal Lobe; Pathophysiology; Surgery; pathology*. Oxford University Press. 1988.
- Burwell, R.D., and Amaral, D.G. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol*, 391(3):293-321., 1998.
- Campos, A.R.; Clusmann, H.; von Lehe, M.; Niehusmann, P.; Becker, A.J.; Schramm, J.; and Urbach, H. Simple and complex dysembryoplastic neuroepithelial tumors (DNT) variants: clinical profile, MRI, and histopathology. *Neuroradiology*, 51(7):433-43, 2009.

- Campos, B.A.; Yasuda, C.L.; Castellano, G.; Bilevicius, E.; Li, L.M.; and Cendes, F. Proton MRS may predict AED response in patients with TLE. *Epilepsia*, 51(5):783-8, 2010.
- Capizzano, A.A.; Vermathen, P.; Laxer, K.D.; Ende, G.R.; Norman, D.; Rowley, H.; Matson, G.B.; Maudsley, A.A.; Segal, M.R.; and Weiner, M.W. Temporal lobe epilepsy: qualitative reading of 1H MR spectroscopic images for presurgical evaluation. *Radiology*, 218(1):144-51, 2001.
- Cascino, G.D.; Jack, C.R., Jr.; Parisi, J.E.; Sharbrough, F.W.; Hirschorn, K.A.; Meyer, F.B.; Marsh, W.R.; and O'Brien, P.C. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol*, 30(1):31-6, 1991.
- Cavalheiro, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, 16(1-2):33-7., 1995.
- Cavalheiro, E.A.; Silva, D.F.; Turski, W.A.; Calderazzo-Filho, L.S.; Bortolotto, Z.A.; and Turski, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Brain Res*, 465(1-2):43-58., 1987.
- Cavus, I.; Kasoff, W.S.; Cassaday, M.P.; Jacob, R.; Gueorguieva, R.; Sherwin, R.S.; Krystal, J.H.; Spencer, D.D.; and Abi-Saab, W.M. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol*, 57(2):226-35, 2005.
- Cendes, F.; Andermann, F.; Dubeau, F.; and Arnold, D.L. Proton magnetic resonance spectroscopic images and MRI volumetric studies for lateralization of temporal lobe epilepsy. *Magn Reson Imaging*, 13(8):1187-91, 1995.
- Cendes, F.; Andermann, F.; Dubeau, F.; Matthews, P.M.; and Arnold, D.L. Normalization of neuronal metabolic dysfunction after surgery for temporal lobe epilepsy. Evidence from proton MR spectroscopic imaging. *Neurology*, 49(6):1525-33, 1997.
- Cendes, F.; Andermann, F.; Gloor, P.; Evans, A.; Jones-Gotman, M.; Watson, C.; Melanson, D.; Olivier, A.; Peters, T.; Lopes-Cendes, I.; and et al. MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 43(4):719-25, 1993.
- Cendes, F.; Andermann, F.; Preul, M.C.; and Arnold, D.L. Lateralization of temporal lobe epilepsy based on regional metabolic abnormalities in proton magnetic resonance spectroscopic images. *Ann Neurol*, 35(2):211-6, 1994.
- Cendes, F.; Caramanos, Z.; Andermann, F.; Dubeau, F.; and Arnold, D.L. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and magnetic resonance imaging volumetry in the lateralization of temporal lobe epilepsy: a series of 100 patients. *Ann Neurol*, 42(5):737-46, 1997.
- Chabardes, S.; Kahane, P.; Minotti, L.; Tassi, L.; Grand, S.; Hoffmann, D.; and Benabid, A.L. The temporopolar cortex plays a pivotal role in temporal lobe seizures. *Brain*, 128(Pt 8):1818-31, 2005.
- Chalecka-Franaszek, E., and Chuang, D.M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15):8745-50., 1999.
- Chapman, D.; Oldfield, E.; Daskocilova, D.; and Schneider, B. NMR of gel and liquid crystalline phospholipids spinning at the 'magic angle'. *FEBS Lett*, 25(2):261-264, 1972.
- Chassoux, F. [Malformation of cortical development: which strategy is best?]. *Neurochirurgie*, 54(3):272-81, 2008.
- Chassoux, F.; Semah, F.; Bouilleret, V.; Landre, E.; Devaux, B.; Turak, B.; Nataf, F.; and Roux, F.X. Metabolic changes and electro-clinical patterns in mesio-temporal lobe epilepsy: a correlative study. *Brain*, 127(Pt 1):164-74, 2004.
- Chen, J.H.; Sambol, E.B.; Kennealey, P.T.; O'Connor, R.B.; DeCarolis, P.L.; Cory, D.G.; and Singer, S. Water suppression without signal loss in HR-MAS 1H NMR of cells and tissues. *J Magn Reson*, 171(1):143-50, 2004.
- Chen, R.; Mias, G.I.; Li-Pook-Than, J.; Jiang, L.; Lam, H.Y.; Chen, R.; Miriami, E.; Karczewski, K.J.; Hariharan, M.; Dewey, F.E.; Cheng, Y.; Clark, M.J.; Im, H.; Habegger, L.; Balasubramanian, S.; O'Huallachain, M.; Dudley, J.T.; Hillenmeyer, S.; Haraksingh, R.; Sharon, D.; Euskirchen, G.; Lacroute, P.; Bettinger, K.; Boyle, A.P.; Kasowski, M.; Grubert, F.; Seki, S.; Garcia, M.; Whirl-Carrillo, M.; Gallardo, M.; Blasco, M.A.; Greenberg, P.L.; Snyder, P.; Klein, T.E.; Altman, R.B.; Butte, A.J.; Ashley, E.A.; Gerstein, M.; Nadeau, K.C.; Tang, H.; and Snyder, M. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*, 148(6):1293-307, 2012.

- Chu, W.J.; Hetherington, H.P.; Kuzniecky, R.I.; Simor, T.; Mason, G.F.; and Elgavish, G.A. Lateralization of human temporal lobe epilepsy by <sup>31</sup>P NMR spectroscopic imaging at 4.1 T. *Neurology*, 51(2):472-9, 1998.
- Chu, W.J.; Hetherington, H.P.; Kuzniecky, R.J.; Vaughan, J.T.; Twieg, D.B.; Faught, R.E.; Gilliam, F.G.; Hugg, J.W.; and Elgavish, G.A. Is the intracellular pH different from normal in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy? A <sup>31</sup>P NMR study. *Neurology*, 47(3):756-60, 1996.
- Clusmann, H.; Kral, T.; Fackeldey, E.; Blumcke, I.; Helmstaedter, C.; von Oertzen, J.; Urbach, H.; and Schramm, J. Lesional mesial temporal lobe epilepsy and limited resections: prognostic factors and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(11):1589-96, 2004.
- Clusmann, H.; Schramm, J.; Kral, T.; Helmstaedter, C.; Ostertun, B.; Fimmers, R.; Haun, D.; and Elger, C.E. Prognostic factors and outcome after different types of resection for temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg*, 97(5):1131-41, 2002.
- Cohen-Gadol, A.A.; Pan, J.W.; Kim, J.H.; Spencer, D.D.; and Hetherington, H.H. Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis. *J Neurosurg*, 101(4):613-20, 2004.
- Connelly, A.; Jackson, G.D.; Duncan, J.S.; King, M.D.; and Gadian, D.G. Magnetic resonance spectroscopy in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 44(8):1411-7, 1994.
- Corona, G.; Rizzolio, F.; Giordano, A.; and Toffoli, G. Pharmaco-metabolomics: an emerging "omics" tool for the personalization of anticancer treatments and identification of new valuable therapeutic targets. *J Cell Physiol*, 227(7):2827-31, 2012.
- Crespel, A.; Rigau, V.; Coubes, P.; Rousset, M.C.; de Bock, F.; Okano, H.; Baldy-Moulinier, M.; Bockaert, J.; and Lerner-Natoli, M. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 19(3):436-50., 2005.
- Cross, J.H.; Connelly, A.; Jackson, G.D.; Johnson, C.L.; Neville, B.G.; and Gadian, D.G. Proton magnetic resonance spectroscopy in children with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 39(1):107-13, 1996.
- Danbolt, N.C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65(1):1-105, 2001.
- Dumas-Duport, C., and Varlet, P. [Dysembryoplastic neuroepithelial tumors]. *Rev Neurol (Paris)*, 159(6-7 Pt 1):622-36, 2003.
- Davila, M.; Candiota, A.P.; Pumarola, M.; Arus, C. Minimization of spectral pattern changes during HRMAS experiments at 37 degrees celsius by prior focused microwave irradiation. *MAGMA*, 25(5):401-10, 2012.
- Davies, K.G.; Hermann, B.P.; Dohan, F.C., Jr.; Foley, K.T.; Bush, A.J.; and Wyler, A.R. Relationship of hippocampal sclerosis to duration and age of onset of epilepsy, and childhood febrile seizures in temporal lobectomy patients. *Epilepsy Res*, 24(2):119-26, 1996.
- Dawodu, S., and Thom, M. Quantitative neuropathology of the entorhinal cortex region in patients with hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 46(1):23-30, 2005.
- de Graaf, R.A.; Chowdhury, G.M.; Brown, P.B.; Rothman, D.L.; and Behar, K.L. In situ 3D magnetic resonance metabolic imaging of microwave-irradiated rodent brain: a new tool for metabolomics research. *J Neurochem*, 109(2):494-501, 2009.
- de Lanerolle, N.C.; Brines, M.L.; Kim, J.H.; Williamson, A.; Philips, M.F.; and Spencer, D.D. Neurochemical remodelling of the hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, 9:205-19, 1992.
- de Lanerolle, N.C.; Kim, J.H.; Williamson, A.; Spencer, S.S.; Zaveri, H.P.; Eid, T.; and Spencer, D.D. A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia*, 44(5):677-87, 2003.
- de Lanerolle, N.C.; Lee, T.S.; and Spencer, D.D. Histopathology of Human Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors, 2011
- SourceJasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. , 2012.
- de Tisi, J.; Bell, G.S.; Peacock, J.L.; McEvoy, A.W.; Harkness, W.F.; Sander, J.W.; and Duncan, J.S. The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. *Lancet*, 378(9800):1388-95, 2011.

- Delgado, T.C.; Violante, I.R.; Nieto-Charques, L.; and Cerdan, S. Neuroglial metabolic compartmentation underlying leptin deficiency in the obese ob/ob mice as detected by magnetic resonance imaging and spectroscopy methods. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(12):2257-66, 2011.
- Detour, J.; Elbayed, K.; Piotto, M.; Moussallieh, F.M.; Nehlig, A.; and Namer, I.J. Ultrafast in vivo microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J Neurosci Methods*, 201(1):89-97, 2011.
- Detour, J.; Schroeder, H.; Desor, D.; and Nehlig, A. A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia*, 46(4):499-508, 2005.
- Diehl, B.; Najm, I.; Mohamed, A.; Wyllie, E.; Babb, T.; Ying, Z.; Hilbig, A.; Bingaman, W.; Luders, H.O.; and Ruggieri, P. Fluid-attenuated inversion recovery: correlations of hippocampal cell densities with signal abnormalities. *Neurology*, 57(6):1029-32, 2001.
- Doelken, M.T.; Stefan, H.; Pauli, E.; Stadlbauer, A.; Struffert, T.; Engelhorn, T.; Richter, G.; Ganslandt, O.; Doerfler, A.; and Hammen, T. (1)H-MRS profile in MRI positive- versus MRI negative patients with temporal lobe epilepsy. *Seizure*, 17(6):490-7, 2008.
- Dube, C.; Boyet, S.; Marescaux, C.; and Nehlig, A. Progressive metabolic changes underlying the chronic reorganization of brain circuits during the silent phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult Rat. *Exp Neurol*, 162(1):146-57., 2000a.
- Dube, C.; Boyet, S.; Marescaux, C.; and Nehlig, A. Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Exp Neurol*, 167(2):227-41., 2001.
- Dube, C.; Marescaux, C.; and Nehlig, A. A metabolic and neuropathological approach to the understanding of plastic changes that occur in the immature and adult rat brain during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. *Epilepsia*, 41 Suppl 6:S36-43, 2000b.
- Duc, C.O.; Trabesinger, A.H.; Weber, O.M.; Meier, D.; Walder, M.; Wieser, H.G.; and Boesiger, P. Quantitative 1H MRS in the evaluation of mesial temporal lobe epilepsy in vivo. *Magn Reson Imaging*, 16(8):969-79, 1998.
- Duncan, J. The current status of neuroimaging for epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 22(2):179-84, 2009.
- During, M.J., and Spencer, D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, 341(8861):1607-10, 1993.
- Eichenbaum, H.; Schoenbaum, G.; Young, B.; and Bunsey, M. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13500-7., 1996.
- Eid, T.; Thomas, M.J.; Spencer, D.D.; Runden-Pran, E.; Lai, J.C.; Malthankar, G.V.; Kim, J.H.; Danbolt, N.C.; Ottersen, O.P.; and de Lanerolle, N.C. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*, 363(9402):28-37, 2004.
- Eid, T.; Williamson, A.; Lee, T.S.; Petroff, O.A.; and de Lanerolle, N.C. Glutamate and astrocytes--key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*, 49 Suppl 2:42-52, 2008.
- Ekstrand, K.E.; Dixon, R.L.; Raben, M.; and Ferree, C.R. Proton NMR relaxation times in the peripheral blood of cancer patients. *Phys Med Biol*, 22(5):925-31, 1977.
- El Hage, M.; Baverel, G.; and Martin, G. Effects of valproate on glutamate metabolism in rat brain slices: a (13)C NMR study. *Epilepsy Res*, 99(1-2):94-100, 2012.
- Ende, G.R.; Laxer, K.D.; Knowlton, R.C.; Matson, G.B.; Schuff, N.; Fein, G.; and Weiner, M.W. Temporal lobe epilepsy: bilateral hippocampal metabolite changes revealed at proton MR spectroscopic imaging. *Radiology*, 202(3):809-17, 1997.
- Engel, J., Jr. Classification of epileptic disorders. *Epilepsia*, 42(3):316, 2001.
- Erb G. Application de la RMN HRMAS en cancérologie ; Modèles métaboliques de classification des tumeurs. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2008.
- Fan, T.W.; Higashi, R.M.; Lane, A.N.; and Jardetzky, O. Combined use of 1H-NMR and GC-MS for metabolite monitoring and in vivo 1H-NMR assignments. *Biochim Biophys Acta*, 882(2):154-67, 1986.

- Fellah, S.; Callot, V.; Viout, P.; Confort-Gouny, S.; Scavarda, D.; Dory-Lautrec, P.; Figarella-Branger, D.; Cozzone, P.J.; and Girard, N. Epileptogenic brain lesions in children: the added-value of combined diffusion imaging and proton MR spectroscopy to the presurgical differential diagnosis. *Childs Nerv Syst*, 28(2):273-82, 2012.
- Fernandes, M.J.; Dube, C.; Boyet, S.; Marescaux, C.; and Nehlig, A. Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(2):195-209., 1999.
- Fisher, R.S.; van Emde Boas, W.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; and Engel, J., Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4):470-2, 2005.
- Folbergrova, J., and Kunz, W.S. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Mitochondrion*, 12(1):35-40, 2012.
- Fountas, K.N.; Tsougos, I.; Gotsis, E.D.; Giannakodimos, S.; Smith, J.R.; and Kapsalaki, E.Z. Temporal pole proton preoperative magnetic resonance spectroscopy in patients undergoing surgery for mesial temporal sclerosis. *Neurosurg Focus*, 32(3):E3, 2012.
- French, J.A.; Williamson, P.D.; Thadani, V.M.; Darcey, T.M.; Mattson, R.H.; Spencer, S.S.; and Spencer, D.D. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol*, 34(6):774-80., 1993.
- Fujikawa, D.G.; Shinmei, S.S.; and Cai, B. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur J Neurosci*, 11(5):1605-14., 1999.
- Gadian, D.G.; Isaacs, E.B.; Cross, J.H.; Connelly, A.; Jackson, G.D.; King, M.D.; Neville, B.G.; and Vargha-Khadem, F. Lateralization of brain function in childhood revealed by magnetic resonance spectroscopy. *Neurology*, 46(4):974-7, 1996.
- Garbelli, R.; Milesi, G.; Medici, V.; Villani, F.; Didato, G.; Deleo, F.; D'Incerti, L.; Morbin, M.; Mazzoleni, G.; Giovagnoli, A.R.; Parente, A.; Zucca, I.; Mastropietro, A.; and Spreafico, R. Blurring in patients with temporal lobe epilepsy: clinical, high-field imaging and ultrastructural study. *Brain*, 2012.
- Garroway, A.N., Magic angle spinning of liquids. *J Magn Res*, 49(1):168-171, 1982.
- Garzillo, C.L., and Mello, L.E. Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia*, 43 Suppl 5:107-9, 2002.
- Geddes, J.W.; Chang, N.G.; Ackley, D.C.; Souldanian, N.S.; McGillis, J.P.; and Yokel, R.A. Postmortem elevation in extracellular glutamate in the rat hippocampus when brain temperature is maintained at physiological levels: implications for the use of human brain autopsy tissues. *Brain Res*, 831(1-2):104-12, 1999.
- Gehlenborg, N.; O'Donoghue, S.I.; Baliga, N.S.; Goesmann, A.; Hibbs, M.A.; Kitano, H.; Kohlbacher, O.; Neuweger, H.; Schneider, R.; Tenenbaum, D.; and Gavin, A.C. Visualization of omics data for systems biology. *Nat Methods*, 7(3 Suppl):S56-68, 2010.
- Germano, I.M.; Poulin, N.; and Olivier, A. Reoperation for recurrent temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg*, 81(1):31-6, 1994.
- Gilliam, F.; Faught, E.; Martin, R.; Bowling, S.; Bilir, E.; Thomas, J.; Morawetz, R.; and Kuzniecky, R. Predictive value of MRI-identified mesial temporal sclerosis for surgical outcome in temporal lobe epilepsy: an intent-to-treat analysis. *Epilepsia*, 41(8):963-6, 2000.
- Gok, B.; Jallo, G.; Hayeri, R.; Wahl, R.; and Aygun, N. The evaluation of FDG-PET imaging for epileptogenic focus localization in patients with MRI positive and MRI negative temporal lobe epilepsy. *Neuroradiology*, 55(5):541-50, 2013.
- Goldman M. Histoire de la RMN, autour de ses premiers acteurs et après...L'actualité chimique ; Mars n°273, 2004.
- Golovko, M.Y., and Murphy, E.J. An improved LC-MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave irradiation and liquid-liquid extraction. *J Lipid Res*, 49(4):893-902, 2008.
- Goodacre, R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot*, 56(410):245-54, 2005.

- Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W.B.; Harrigan, G.G.; and Kell, D.B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, 22(5):245-52, 2004.
- Graebenitz, S.; Kedo, O.; Speckmann, E.J.; Gorji, A.; Panneck, H.; Hans, V.; Palomero-Gallagher, N.; Schleicher, A.; Zilles, K.; and Pape, H.C. Interictal-like network activity and receptor expression in the epileptic human lateral amygdala. *Brain*, 134(Pt 10):2929-47, 2011.
- Gruetter, R.; Novotny, E.J.; Boulware, S.D.; Mason, G.F.; Rothman, D.L.; Shulman, G.I.; Prichard, J.W.; and Shulman, R.G. Localized <sup>13</sup>C NMR spectroscopy in the human brain of amino acid labeling from D-[1-<sup>13</sup>C]glucose. *J Neurochem*, 63(4):1377-85, 1994.
- Gruetter, R.; Weisdorf, S.A.; Rajanayagan, V.; Terpstra, M.; Merkle, H.; Truwit, C.L.; Garwood, M.; Nyberg, S.L.; and Ugurbil, K. Resolution improvements in in vivo <sup>1</sup>H NMR spectra with increased magnetic field strength. *J Magn Reson*, 135(1):260-4, 1998.
- Grunewald, R.A.; Farrow, T.; Vaughan, P.; Rittey, C.D.; and Mundy, J. A magnetic resonance study of complicated early childhood convulsion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(5):638-42, 2001.
- Guye, M.; Le Fur, Y.; Confort-Gouny, S.; Ranjeva, J.P.; Bartolomei, F.; Regis, J.; Raybaud, C.A.; Chauvel, P.; and Cozzone, P.J. Metabolic and electrophysiological alterations in subtypes of temporal lobe epilepsy: a combined proton magnetic resonance spectroscopic imaging and depth electrodes study. *Epilepsia*, 43(10):1197-209, 2002.
- Haberg, A.; Qu, H.; Haraldseth, O.; Unsgard, G.; and Sonnewald, U. In vivo effects of adenosine A1 receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *J Neurochem*, 74(1):327-33, 2000.
- Hajek, M.; Dezortova, M.; and Komarek, V. <sup>1</sup>H MR spectroscopy in patients with mesial temporal epilepsy. *Magma*, 7(2):95-114, 1998.
- Hajek, M.; Dezortova, M.; and Krsek, P. (1)H MR spectroscopy in epilepsy. *Eur J Radiol*, 67(2):258-67, 2008.
- Hajek, M.; Krsek, P.; Dezortova, M.; Marusic, P.; Zamecnik, J.; Kyncl, M.; Tomasek, M.; Krijtova, H.; and Komarek, V. <sup>1</sup>H MR spectroscopy in histopathological subgroups of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur Radiol*, 19(2):400-8, 2009.
- Hammen, T.; Hildebrandt, M.; Stadlbauer, A.; Doelken, M.; Engelhorn, T.; Kerling, F.; Kasper, B.; Romstoeck, J.; Ganslandt, O.; Nimsky, C.; Blumcke, I.; Doerfler, A.; and Stefan, H. Non-invasive detection of hippocampal sclerosis: correlation between metabolite alterations detected by (1)H-MRS and neuropathology. *NMR Biomed*, 21(6):545-52, 2008.
- Hanstock, C.C.; Rothman, D.L.; Prichard, J.W.; Jue, T.; and Shulman, R.G. Spatially localized <sup>1</sup>H NMR spectra of metabolites in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(6):1821-5, 1988.
- Hao, J.; Zou, X.; Wilson, M.P.; Davies, N.P.; Sun, Y.; Peet, A.C.; and Arvanitis, T.N. A comparative study of feature extraction and blind source separation of independent component analysis (ICA) on childhood brain tumour <sup>1</sup>H magnetic resonance spectra. *NMR Biomed*, 22(8):809-18, 2009.
- Harris, T.; Bretschneider, C.; and Frydman, L. Dissolution DNP NMR with solvent mixtures: substrate concentration and radical extraction. *J Magn Reson*, 211(1):96-100, 2011.
- Hashimoto, R.; Fujimaki, K.; Jeong, M.R.; Christ, L.; and Chuang, D.M. Lithium-induced inhibition of Src tyrosine kinase in rat cerebral cortical neurons: a role in neuroprotection against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity. *FEBS Lett*, 538(1-3):145-8., 2003.
- Hauser, W.A. Status epilepticus: epidemiologic considerations. *Neurology*, 40(5 Suppl 2):9-13, 1990.
- Helms, G.; Ciumas, C.; Kyaga, S.; and Savic, I. Increased thalamus levels of glutamate and glutamine (Glx) in patients with idiopathic generalised epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77(4):489-94, 2006.
- Helmstaedter, C., and Elger, C.E. Cognitive consequences of two-thirds anterior temporal lobectomy on verbal memory in 144 patients: a three-month follow-up study. *Epilepsia*, 37(2):171-80, 1996.
- Helmstaedter, C., and Kurthen, M. Memory and epilepsy: characteristics, course, and influence of drugs and surgery. *Curr Opin Neurol*, 14(2):211-6, 2001.
- Helmstaedter, C.; Petzold, I.; and Bien, C.G. The cognitive consequence of resecting nonlesional tissues in epilepsy surgery--results from MRI- and histopathology-negative patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 52(8):1402-8, 2011a.

- Helmstaedter, C.; Roeske, S.; Kaaden, S.; Elger, C.E.; and Schramm, J. Hippocampal resection length and memory outcome in selective epilepsy surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(12):1375-81, 2011b.
- Hemb, M.; Palmi, A.; Paglioli, E.; Paglioli, E.B.; Costa da Costa, J.; Azambuja, N.; Portuguese, M.; Viuniski, V.; Booij, L.; and Nunes, M.L. An 18-year follow-up of seizure outcome after surgery for temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(7):800-5, 2013.
- Hermann, B.P.; Wyler, A.R.; Somes, G.; Berry, A.D., 3rd; and Dohan, F.C., Jr. Pathological status of the mesial temporal lobe predicts memory outcome from left anterior temporal lobectomy. *Neurosurgery*, 31(4):652-6; discussion 656-7, 1992.
- Hetherington, H.; Kuzniecky, R.; Pan, J.; Mason, G.; Morawetz, R.; Harris, C.; Faught, E.; Vaughan, T.; and Pohost, G. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopic imaging of human temporal lobe epilepsy at 4.1 T. *Ann Neurol*, 38(3):396-404, 1995.
- Hetherington, H.P.; Kuzniecky, R.I.; Vives, K.; Devinsky, O.; Pacia, S.; Luciano, D.; Vasquez, B.; Haut, S.; Spencer, D.D.; and Pan, J.W. A subcortical network of dysfunction in TLE measured by magnetic resonance spectroscopy. *Neurology*, 69(24):2256-65, 2007.
- Ho, S.S.; Consalvo, D.; Gilliam, F.; Faught, E.; Bilir, E.; Morawetz, R.; and Kuzniecky, R.I. Amygdala atrophy and seizure outcome after temporal lobe epilepsy surgery. *Neurology*, 51(5):1502-4, 1998.
- Hollywood, K.; Brison, D.R.; and Goodacre, R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, 6(17):4716-23, 2006.
- Honchar, M.P.; Olney, J.W.; and Sherman, W.R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science*, 220(4594):323-5., 1983.
- Hosoi, R.; Kitano, D.; Momosaki, S.; Kuse, K.; Gee, A.; and Inoue, O. Remarkable increase in 14C-acetate uptake in an epilepsy model rat brain induced by lithium-pilocarpine. *Brain Res*, 1311:158-65, 2010.
- Houser, C.R.; Miyashiro, J.E.; Swartz, B.E.; Walsh, G.O.; Rich, J.R.; and Delgado-Escueta, A.V. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci*, 10(1):267-82., 1990.
- Hugg, J.W.; Duijn, J.H.; Matson, G.B.; Maudsley, A.A.; Tsuruda, J.S.; Gelinas, D.F.; and Weiner, M.W. Elevated lactate and alkalosis in chronic human brain infarction observed by 1H and 31P MR spectroscopic imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12(5):734-44, 1992.
- Hugg, J.W.; Kuzniecky, R.I.; Gilliam, F.G.; Morawetz, R.B.; Fraught, R.E.; and Hetherington, H.P. Normalization of contralateral metabolic function following temporal lobectomy demonstrated by 1H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol*, 40(2):236-9, 1996.
- Hugg, J.W.; Laxer, K.D.; Matson, G.B.; Maudsley, A.A.; and Weiner, M.W. Neuron loss localizes human temporal lobe epilepsy by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol*, 34(6):788-94, 1993.
- Jallon, P. [Epidemiology of drug-resistant epilepsies]. *Rev Neurol (Paris)*, 160 Spec No 1:5S22-30, 2004.
- Janzky, J.; Janzky, I.; Schulz, R.; Hoppe, M.; Behne, F.; Pannek, H.W.; and Ebner, A. Temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: predictors for long-term surgical outcome. *Brain*, 128(Pt 2):395-404, 2005.
- Ji, G.J.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Wang, J.; Liu, D.Q.; Zang, Y.F.; Liao, W.; and Lu, G. Disrupted causal connectivity in mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS One*, 8(5):e63183, 2013.
- Jokeit, H.; Ebner, A.; Arnold, S.; Schuller, M.; Antke, C.; Huang, Y.; Steinmetz, H.; Seitz, R.J.; and Witte, O.W. Bilateral reductions of hippocampal volume, glucose metabolism, and wada hemispheric memory performance are related to the duration of mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurol*, 246(10):926-33., 1999.
- Jorda, E.G.; Verdager, E.; Canudas, A.M.; Jimenez, A.; De Arriba, S.G.; Allgaier, C.; Pallas, M.; and Camins, A. Implication of cyclin-dependent kinase 5 in the neuroprotective properties of lithium. *Neuroscience*, 134(3):1001-11, 2005.

- Juhasz, C.; Nagy, F.; Watson, C.; da Silva, E.A.; Muzik, O.; Chugani, D.C.; Shah, J.; and Chugani, H.T. Glucose and [11C]flumazenil positron emission tomography abnormalities of thalamic nuclei in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 53(9):2037-45, 1999.
- Jung, R.E.; Haier, R.J.; Yeo, R.A.; Rowland, L.M.; Petropoulos, H.; Levine, A.S.; Sibbitt, W.L.; and Brooks, W.M. Sex differences in N-acetylaspartate correlates of general intelligence: an 1H-MRS study of normal human brain. *Neuroimage*, 26(3):965-72, 2005.
- Jung, R.E.; Yeo, R.A.; Chiulli, S.J.; Sibbitt, W.L., Jr.; Weers, D.C.; Hart, B.L.; and Brooks, W.M. Biochemical markers of cognition: a proton MR spectroscopy study of normal human brain. *Neuroreport*, 10(16):3327-31, 1999.
- Kahane, P., and Bartolomei, F. Temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: lessons from depth EEG recordings. *Epilepsia*, 51 Suppl 1:59-62, 2010.
- Kalviainen, R.; Salmenpera, T.; Partanen, K.; Vainio, P.; Riekkinen, P., Sr.; and Pitkanen, A. MRI volumetry and T2 relaxometry of the amygdala in newly diagnosed and chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 28(1):39-50, 1997.
- Kanemoto, K.; Takuji, N.; Kawasaki, J.; and Kawai, I. Characteristics and treatment of temporal lobe epilepsy with a history of complicated febrile convulsion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64(2):245-8, 1998.
- Kanner, A.M.; Kaydanova, Y.; deToledo-Morrell, L.; Morrell, F.; Smith, M.C.; Bergen, D.; Pierre-Louis, S.J.; and Ristanovic, R. Tailored anterior temporal lobectomy. Relation between extent of resection of mesial structures and postsurgical seizure outcome. *Arch Neurol*, 52(2):173-8, 1995.
- Kauppinen, R.A., and Williams, S.R. Nondestructive detection of glutamate by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in cortical brain slices from the guinea pig: evidence for changes in detectability during severe anoxic insults. *J Neurochem*, 57(4):1136-44, 1991.
- Kauppinen, R.A.; Williams, S.R.; Busza, A.L.; and van Bruggen, N. Applications of magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted imaging to the study of brain biochemistry and pathology. *Trends Neurosci*, 16(3):88-95, 1993.
- Kell, D.B. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol*, 7(3):296-307, 2004.
- Kell, D.B.; Brown, M.; Davey, H.M.; Dunn, W.B.; Spasic, I.; and Oliver, S.G. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nat Rev Microbiol*, 3(7):557-65, 2005.
- Keller, S.S., and Roberts, N. Voxel-based morphometry of temporal lobe epilepsy: an introduction and review of the literature. *Epilepsia*, 49(5):741-57, 2008.
- Keun, H.C.; Beckonert, O.; Griffin, J.L.; Richter, C.; Moskau, D.; Lindon, J.C.; and Nicholson, J.K. Cryogenic probe <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of urine for metabolomic studies. *Anal Chem*, 74(17):4588-93, 2002.
- King, D.; Bronen, R.A.; Spencer, D.D.; and Spencer, S.S. Topographic distribution of seizure onset and hippocampal atrophy: relationship between MRI and depth EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 103(6):692-7, 1997a.
- King, D.; Spencer, S.S.; McCarthy, G.; and Spencer, D.D. Surface and depth EEG findings in patients with hippocampal atrophy. *Neurology*, 48(5):1363-7, 1997b.
- Kobayashi, E.; Lopes-Cendes, I.; Guerreiro, C.A.; Sousa, S.C.; Guerreiro, M.M.; and Cendes, F. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 56(2):166-72, 2001.
- Kork, F.; Holthues, J.; Hellweg, R.; Jankowski, V.; Tepel, M.; Ohring, R.; Heuser, I.; Bierbrauer, J.; Peters, O.; Schlattmann, P.; Zidek, W.; and Jankowski, J. A possible new diagnostic biomarker in early diagnosis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 6(6):519-24, 2009.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10):5768-73., 1999.
- Kuba, R.; Tyrlikova, I.; Chrastina, J.; Slana, B.; Pazourkova, M.; Hemza, J.; Brazdil, M.; Novak, Z.; Hermanova, M.; and Rektor, I. "MRI-negative PET-positive" temporal lobe epilepsy: invasive EEG findings, histopathology, and postoperative outcomes. *Epilepsy Behav*, 22(3):537-41, 2011.



- Kudin, A.P.; Zsurka, G.; Elger, C.E.; and Kunz, W.S. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 218(2):326-32, 2009.
- Kullmann, D.M. What's wrong with the amygdala in temporal lobe epilepsy? *Brain*, 134(Pt 10):2800-1, 2011.
- Kun, L.N.; Ling, L.W.; Wah, Y.W.; and Lian, T.T. Epidemiologic study of epilepsy in young Singaporean men. *Epilepsia*, 40(10):1384-7, 1999.
- Kurthen M. Diagnostic préopératoire et traitement chirurgical des épilepsies *Forum Med Suisse*, 8(44):836–843, 2008.
- Kuzniecky, R.; Hetherington, H.; Ho, S.; Pan, J.; Martin, R.; Gilliam, F.; Hugg, J.; and Faught, E. Topiramate increases cerebral GABA in healthy humans. *Neurology*, 51(2):627-9, 1998.
- Kuzniecky, R.; Hetherington, H.; Pan, J.; Hugg, J.; Palmer, C.; Gilliam, F.; Faught, E.; and Morawetz, R. Proton spectroscopic imaging at 4.1 tesla in patients with malformations of cortical development and epilepsy. *Neurology*, 48(4):1018-24, 1997.
- Kuzniecky, R.; Hugg, J.W.; Hetherington, H.; Butterworth, E.; Bilir, E.; Faught, E.; and Gilliam, F. Relative utility of 1H spectroscopic imaging and hippocampal volumetry in the lateralization of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 51(1):66-71, 1998a.
- Kuzniecky, R.; Palmer, C.; Hugg, J.; Martin, R.; Sawrie, S.; Morawetz, R.; Faught, E.; and Knowlton, R. Magnetic resonance spectroscopic imaging in temporal lobe epilepsy: neuronal dysfunction or cell loss? *Arch Neurol*, 58(12):2048-53, 2001b.
- Kuzniecky, R.I., and Barkovich, A.J. Malformations of cortical development and epilepsy. *Brain Dev*, 23(1):2-11, 2001a.
- Kwan, P., and Brodie, M.J. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*, 342(5):314-9, 2000.
- LeDoux, J.E. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res*, 58(1-2):69-79., 1993.
- Lee, E.M.; Park, G.Y.; Im, K.C.; Kim, S.T.; Woo, C.W.; Chung, J.H.; Kim, K.S.; Kim, J.S.; Shon, Y.M.; Kim, Y.I.; and Kang, J.K. Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia*, 53(5):860-9, 2012.
- Lee, J.W.; Reutens, D.C.; Dubeau, F.; Evans, A.; and Andermann, F. Morphometry in temporal lobe epilepsy. *Magn Reson Imaging*, 13(8):1073-80, 1995.
- Lee, M.G.; Chou, J.Y.; Lee, K.H.; Choi, B.J.; Kim, S.K.; and Kim, C.Y. MK-801 augments pilocarpine-induced electrographic seizure but protects against brain damage in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 21(2):331-44., 1997.
- Lemos, T., and Cavalheiro, E.A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res*, 102(3):423-8, 1995.
- Leroy, C.; Roch, C.; Koning, E.; Namer, I.J.; and Nehlig, A. In the lithium-pilocarpine model of epilepsy, brain lesions are not linked to changes in blood-brain barrier permeability: an autoradiographic study in adult and developing rats. *Exp Neurol*, 182(2):361-72., 2003.
- Li, L.M.; Cendes, F.; Andermann, F.; Dubeau, F.; and Arnold, D.L. Spatial extent of neuronal metabolic dysfunction measured by proton MR spectroscopic imaging in patients with localization-related epilepsy. *Epilepsia*, 41(6):666-74, 2000.
- Li, L.M.; Cendes, F.; Bastos, A.C.; Andermann, F.; Dubeau, F.; and Arnold, D.L. Neuronal metabolic dysfunction in patients with cortical developmental malformations: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Neurology*, 50(3):755-9, 1998.
- Lin, D.; Tabb, D.L.; and Yates, J.R., 3rd. Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 1646(1-2):1-10, 2003.
- Lindon, J.C.; Holmes, E.; and Nicholson, J.K. So what's the deal with metabolomics? *Anal Chem*, 75(17):384A-391A, 2003.
- Lively, S., and Brown, I.R. Analysis of the extracellular matrix protein SC1 during reactive gliosis in the rat lithium-pilocarpine seizure model. *Brain Res*, 1163:1-9, 2007.
- Loeb, J.A. Identifying targets for preventing epilepsy using systems biology. *Neurosci Lett*, 497(3):205-12, 2011.
- Login, G.R., and Dvorak, A.M. Application of microwave fixation techniques in pathology to neuroscience studies: a review. *J Neurosci Methods*, 55(2):173-82, 1994.

- Loscher, W. Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol*, 53(2):239-58, 1997.
- Loup, F.; Wieser, H.G.; Yonekawa, Y.; Aguzzi, A.; and Fritschy, J.M. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 20(14):5401-19., 2000.
- Lowe, I. J. Free induction decays of rotating solids. *Physical Review Letters*, 2, 285–287, 1959.
- Lu, D.; Margouleff, C.; Rubin, E.; Labar, D.; Schaul, N.; Ishikawa, T.; Kazumata, K.; Antonini, A.; Dhawan, V.; Hyman, R.A.; and Eidelberg, D. Temporal lobe epilepsy: correlation of proton magnetic resonance spectroscopy and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Magn Reson Med*, 37(1):18-23, 1997.
- Lust WD, Murakami N, De Azeredo F, Passonneau JV. A comparison of methods of brain fixation. In: Passonneau JV, Hawkins RA, Welsch FA, Lust WD, editors. *Cerebral Metabolism and Neural Function*. p. 10–9, New York, Williams & Wilkins, 1980.
- Lust, W.D.; Passonneau, J.V.; and Veech, R.L. Cyclic adenosine monophosphate, metabolites, and phosphorylase in neural tissue: a comparison a methods of fixation. *Science*, 181(4096):280-2, 1973.
- Macomber R.S. A complete Introduction to modern NMR spectroscopy. John Wiley & Sons, New-York, 1998.
- Magistretti, P.J.; Pellerin, L.; Rothman, D.L.; and Shulman, R.G. Energy on demand. *Science*, 283(5401):496-7, 1999.
- Magloczky, Z.; Wittner, L.; Borhegyi, Z.; Halasz, P.; Vajda, J.; Czirjak, S.; and Freund, T.F. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, 96(1):7-25, 2000.
- Malmgren, K., and Thom, M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. *Epilepsia*, 53 Suppl 4:19-33, 2012.
- Margerison, J.H., and Corsellis, J.A. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, 89(3):499-530., 1966.
- Margineanu, D.G. Systems biology impact on antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res*, 98(2-3):104-15, 2012.
- Marinho, M.M.; de Sousa, F.C.; de Bruin, V.M.; Vale, M.R.; and Viana, G.S. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem Int*, 33(4):299-306, 1998.
- Marin-Valencia, I.; Cho, S.K.; Rakheja, D.; Hatanpaa, K.J.; Kapur, P.; Mashimo, T.; Jindal, A.; Vemireddy, V.; Good, L.B.; Raisanen, J.; Sun, X.; Mickey, B.; Choi, C.; Takahashi, M.; Togao, O.; Pascual, J.M.; Deberardinis, R.J.; Maher, E.A.; Malloy, C.R.; and Bachoo, R.M. Glucose metabolism via the pentose phosphate pathway, glycolysis and Krebs cycle in an orthotopic mouse model of human brain tumors. *NMR Biomed*, 25(10):1177-86, 2012.
- Martinez-Bisbal, M.C.; Marti-Bonmati, L.; Piquer, J.; Revert, A.; Ferrer, P.; Llacer, J.L.; Piotta, M.; Assemat, O.; and Celda, B. 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed*, 17(4):191-205, 2004.
- Mathern, G.W.; Adelson, P.D.; Cahan, L.D.; and Leite, J.P. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res*, 135:237-51, 2002.
- Mathern, G.W.; Babb, T.L.; Leite, J.P.; Pretorius, K.; Yeoman, K.M.; and Kuhlman, P.A. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res*, 26(1):151-61., 1996.
- Mathern, G.W.; Babb, T.L.; Micevych, P.E.; Blanco, C.E.; and Pretorius, J.K. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neuropathol*, 30(1-2):53-76, 1997.
- Mathern, G.W.; Babb, T.L.; Vickrey, B.G.; Melendez, M.; and Pretorius, J.K. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*, 118(Pt 1):105-18., 1995.

- Mathern, G.W.; Mendoza, D.; Lozada, A.; Pretorius, J.K.; Dehnes, Y.; Danbolt, N.C.; Nelson, N.; Leite, J.P.; Chimelli, L.; Born, D.E.; Sakamoto, A.C.; Assirati, J.A.; Fried, I.; Peacock, W.J.; Ojemann, G.A.; and Adelson, P.D. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 52(3):453-72., 1999.
- Mayanagi, Y.; Watanabe, E.; and Kaneko, Y. Mesial temporal lobe epilepsy: clinical features and seizure mechanism. *Epilepsia*, 37 Suppl 3:57-60, 1996.
- McIntosh, A.M.; Wilson, S.J.; and Berkovic, S.F. Seizure outcome after temporal lobectomy: current research practice and findings. *Epilepsia*, 42(10):1288-307, 2001.
- McKhann, G.M., 2nd; Schoenfeld-McNeill, J.; Born, D.E.; Haglund, M.M.; and Ojemann, G.A. Intraoperative hippocampal electrocorticography to predict the extent of hippocampal resection in temporal lobe epilepsy surgery. *J Neurosurg*, 93(1):44-52, 2000.
- McLean, M.A.; Busza, A.L.; Wald, L.L.; Simister, R.J.; Barker, G.J.; and Williams, S.R. In vivo GABA+ measurement at 1.5T using a PRESS-localized double quantum filter. *Magn Reson Med*, 48(2):233-41, 2002.
- Medina M.A., Deam A.P., Stavinoha W.B. Inactivation of brain tissue by microwave irradiation. In Passoneau J.V., Hawkins R.A., Lust D.W., Welsh F.A. *Cerebral metabolism and neural function*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
- Mello, L.E.; Cavalheiro, E.A.; Tan, A.M.; Kupfer, W.R.; Pretorius, J.K.; Babb, T.L.; and Finch, D.M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34(6):985-95., 1993.
- Melo, T.M.; Nehlig, A.; and Sonnewald, U. Metabolism is normal in astrocytes in chronically epileptic rats: a <sup>13</sup>C NMR study of neuronal-glia interactions in a model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(10):1254-64, 2005.
- Melo, T.M.; Nehlig, A.; and Sonnewald, U. Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem Int*, 48(6-7):498-507, 2006.
- Melo, T.M.; Sonnewald, U.; Bastholm, I.A.; and Nehlig, A. Astrocytes may play a role in the etiology of absence epilepsy: a comparison between immature GAERS not yet expressing seizures and adults. *Neurobiol Dis*, 28(2):227-35, 2007.
- Melo, T.M.; Sonnewald, U.; Touret, M.; and Nehlig, A. Cortical glutamate metabolism is enhanced in a genetic model of absence epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(12):1496-506, 2006.
- Meunier, M.; Bachevalier, J.; Murray, E.A.; Malkova, L.; and Mishkin, M. Effects of aspiration versus neurotoxic lesions of the amygdala on emotional responses in monkeys. *Eur J Neurosci*, 11(12):4403-18., 1999.
- Middleton, D.A.; Bradley, D.P.; Connor, S.C.; Mullins, P.G.; and Reid, D.G. The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue. *Magn Reson Med*, 40(1):166-9, 1998.
- Miller, L.A.; McLachlan, R.S.; Bouwer, M.S.; Hudson, L.P.; and Munoz, D.G. Amygdalar sclerosis: preoperative indicators and outcome after temporal lobectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57(9):1099-105, 1994.
- Milner, B. Psychological defects produced by temporal lobe excision. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 36:244-57, 1958.
- Mitsueda-Ono, T.; Ikeda, A.; Inouchi, M.; Takaya, S.; Matsumoto, R.; Hanakawa, T.; Sawamoto, N.; Mikuni, N.; Fukuyama, H.; and Takahashi, R. Amygdalar enlargement in patients with temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(6):652-7, 2011.
- Moffett, J.R., and Namboodiri, M.A. Differential distribution of N-acetylaspartylglutamate and N-acetylaspartate immunoreactivities in rat forebrain. *J Neurocytol*, 24(6):409-33, 1995.
- Monaghan, D.T., and Cotman, C.W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[<sup>3</sup>H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci*, 5(11):2909-19., 1985.
- Mora, A.; Sabio, G.; Alonso, J.C.; Soler, G.; Centeno, F.; Risco, A.M.; and Cuenda, A. Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Bipolar Disord*, 4(3):195-200., 2002.

- Moran, N.F.; Lemieux, L.; Kitchen, N.D.; Fish, D.R.; and Shorvon, S.D. Extrahippocampal temporal lobe atrophy in temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis. *Brain*, 124(Pt 1):167-75, 2001.
- Moussallieh F.M. La métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS appliquée en cancérologie. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2012.
- Mueller, S.G.; Ebel, A.; Barakos, J.; Scanlon, C.; Cheong, I.; Finlay, D.; Garcia, P.; Weiner, M.W.; and Laxer, K.D. Widespread extrahippocampal NAA/(Cr+Cho) abnormalities in TLE with and without mesial temporal sclerosis. *J Neurol*, 258(4):603-12, 2011.
- Mueller, S.G.; Laxer, K.D.; Suhy, J.; Lopez, R.C.; Flenniken, D.L.; and Weiner, M.W. Spectroscopic metabolic abnormalities in mTLE with and without MRI evidence for mesial temporal sclerosis using hippocampal short-TE MRSI. *Epilepsia*, 44(7):977-80, 2003.
- Muller, C.J.; Bankstahl, M.; Groticke, I.; and Loscher, W. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *Eur J Pharmacol*, 619(1-3):15-24, 2009.
- Munari, C.; Hoffmann, D.; Francione, S.; Kahane, P.; Tassi, L.; Lo Russo, G.; and Benabid, A.L. Stereo-electroencephalography methodology: advantages and limits. *Acta Neurol Scand Suppl*, 152:56-67, discussion 68-9, 1994.
- Namer, I.J.; Bolo, N.R.; Sellal, F.; Nguyen, V.H.; Nedelec, J.F.; Hirsch, E.; and Marescaux, C. Combined measurements of hippocampal N-acetyl-aspartate and T2 relaxation time in the evaluation of mesial temporal lobe epilepsy: correlation with clinical severity and memory performances. *Epilepsia*, 40(10):1424-32, 1999.
- Natsume, J.; Bernasconi, N.; Andermann, F.; and Bernasconi, A. MRI volumetry of the thalamus in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*, 60(8):1296-300, 2003.
- Nehlig, A., and Coles, J.A. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia*, 55(12):1238-50, 2007.
- Nehlig, A.; Wittendorp-Rechenmann, E.; and Lam, C.D. Selective uptake of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular <sup>14</sup>C-trajectory combined with immunohistochemistry. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(9):1004-14, 2004.
- Nelissen, N.; Van Paesschen, W.; Baete, K.; Van Laere, K.; Palmi, A.; Van Billoen, H.; and Dupont, P. Correlations of interictal FDG-PET metabolism and ictal SPECT perfusion changes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neuroimage*, 32(2):684-95, 2006.
- Nelson, P.T.; Schmitt, F.A.; Lin, Y.; Abner, E.L.; Jicha, G.A.; Patel, E.; Thomason, P.C.; Neltner, J.H.; Smith, C.D.; Santacruz, K.S.; Sonnen, J.A.; Poon, L.W.; Gearing, M.; Green, R.C.; Woodard, J.L.; Van Eldik, L.J.; and Kryscio, R.J. Hippocampal sclerosis in advanced age: clinical and pathological features. *Brain*, 134(Pt 5):1506-18, 2011.
- Nicholson, J.K.; Connelly, J.; Lindon, J.C.; and Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*, 1(2):153-61, 2002.
- Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; and Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11):1181-9, 1999.
- Noachtar, S., and Borggraefe, I. Epilepsy surgery: a critical review. *Epilepsy Behav*, 15(1):66-72, 2009.
- Novotny, E.J., Jr. Overview--the role of NMR spectroscopy in epilepsy. *Magn Reson Imaging*, 13(8):1171-3, 1995.
- Okonma, S.V.; Blount, J.P.; and Gross, R.E. Planning extent of resection in epilepsy: limited versus large resections. *Epilepsy Behav*, 20(2):233-40, 2011.
- Oliver, S.G.; Winson, M.K.; Kell, D.B.; and Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*, 16(9):373-8, 1998.
- Opstad, K.S.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; and Howe, F.A. An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning (1)H NMR. *NMR Biomed*, 21(10):1138-47, 2008.
- O'Shea, P. Future medicine shaped by an interdisciplinary new biology. *Lancet*, 379(9825):1544-50, 2012.

- Ottersen, O.P., and Storm-Mathisen, J. Different neuronal localization of aspartate-like and glutamate-like immunoreactivities in the hippocampus of rat, guinea-pig and Senegalese baboon (*Papio papio*), with a note on the distribution of gamma-aminobutyrate. *Neuroscience*, 16(3):589-606, 1985.
- Ozaki, N., and Chuang, D.M. Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. *J Neurochem*, 69(6):2336-44., 1997.
- Paglioli, E.; Palmi, A.; Paglioli, E.; da Costa, J.C.; Portuguese, M.; Martinez, J.V.; Calcagnotto, M.E.; Hoefel, J.R.; Raupp, S.; and Barbosa-Coutinho, L. Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, 45(11):1383-91, 2004.
- Paglioli, E.; Palmi, A.; Portuguese, M.; Paglioli, E.; Azambuja, N.; da Costa, J.C.; da Silva Filho, H.F.; Martinez, J.V.; and Hoefel, J.R. Seizure and memory outcome following temporal lobe surgery: selective compared with nonselective approaches for hippocampal sclerosis. *J Neurosurg*, 104(1):70-8, 2006.
- Pan, J.W.; Kim, J.H.; Cohen-Gadol, A.; Pan, C.; Spencer, D.D.; and Hetherington, H.P. Regional energetic dysfunction in hippocampal epilepsy. *Acta Neurol Scand*, 111(4):218-24, 2005.
- Pan, J.W.; Spencer, D.D.; Kuzniecky, R.; Duckrow, R.B.; Hetherington, H.; and Spencer, S.S. Metabolic networks in epilepsy by MR spectroscopic imaging. *Acta Neurol Scand*, 2012.
- Pan, J.W.; Williamson, A.; Cavus, I.; Hetherington, H.P.; Zaveri, H.; Petroff, O.A.; and Spencer, D.D. Neurometabolism in human epilepsy. *Epilepsia*, 49 Suppl 3:31-41, 2008.
- Pan, J.W.; Zaveri, H.P.; Spencer, D.D.; Hetherington, H.P.; and Spencer, S.S. Intracranial EEG power and metabolism in human epilepsy. *Epilepsy Res*, 87(1):18-24, 2009.
- Parent, J.M. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res*, 50(1-2):179-89., 2002.
- Parent, J.M.; Yu, T.W.; Leibowitz, R.T.; Geschwind, D.H.; Sloviter, R.S.; and Lowenstein, D.H. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 17(10):3727-38., 1997.
- Park, Y.D.; Murro, A.M.; King, D.W.; Gallagher, B.B.; Smith, J.R.; and Yaghmai, F. The significance of ictal depth EEG patterns in patients with temporal lobe epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 99(5):412-5, 1996.
- Patel, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*, 37(12):1951-62, 2004.
- Patel, T.B., and Clark, J.B. Synthesis of N-acetyl-L-aspartate by rat brain mitochondria and its involvement in mitochondrial/cytosolic carbon transport. *Biochem J*, 184(3):539-46, 1979.
- Peeling, J., and Sutherland, G. <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of extracts of human epileptic neocortex and hippocampus. *Neurology*, 43(3 Pt 1):589-94, 1993.
- Pereira de Vasconcelos, A.; Ferrandon, A.; and Nehlig, A. Local cerebral blood flow during lithium-pilocarpine seizures in the developing and adult rat: role of coupling between blood flow and metabolism in the genesis of neuronal damage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(2):196-205, 2002.
- Perry, T.L.; Berry, K.; Hansen, S.; Diamond, S.; and Mok, C. Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. *J Neurochem*, 18(3):513-9, 1971a.
- Perry, T.L., and Hansen, S. Amino acid abnormalities in epileptogenic foci. *Neurology*, 31(7):872-6, 1981a.
- Perry, T.L.; Hansen, S.; Berry, K.; Mok, C.; and Lesk, D. Free amino acids and related compounds in biopsies of human brain. *J Neurochem*, 18(3):521-8, 1971b.
- Perry, T.L.; Hansen, S.; and Gandham, S.S. Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. *J Neurochem*, 36(2):406-10, 1981b.
- Perry, T.L.; Hansen, S.; Kennedy, J.; Wada, J.A.; and Thompson, G.B. Amino acids in human epileptogenic foci. *Arch Neurol*, 32(11):752-4, 1975.
- Persinger, M.A.; Bureau, Y.R.; Kostakos, M.; Peredery, O.; and Falter, H. Behaviors of rats with insidious, multifocal brain damage induced by seizures following single peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav*, 53(5):849-66., 1993.

- Persinger, M.A.; Makarec, K.; and Bradley, J.C. Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav*, 44(1):27-37, 1988.
- Petroff, O.A.; Errante, L.D.; Kim, J.H.; and Spencer, D.D. N-acetyl-aspartate, total creatine, and myo-inositol in the epileptogenic human hippocampus. *Neurology*, 60(10):1646-51, 2003.
- Petroff, O.A.; Errante, L.D.; Rothman, D.L.; Kim, J.H.; and Spencer, D.D. Neuronal and glial metabolite content of the epileptogenic human hippocampus. *Ann Neurol*, 52(5):635-42, 2002a.
- Petroff, O.A.; Errante, L.D.; Rothman, D.L.; Kim, J.H.; and Spencer, D.D. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia*, 43(7):703-10, 2002b.
- Petroff, O.A.; Pleban, L.A.; and Spencer, D.D. Symbiosis between in vivo and in vitro NMR spectroscopy: the creatine, N-acetylaspartate, glutamate, and GABA content of the epileptic human brain. *Magn Reson Imaging*, 13(8):1197-211, 1995.
- Petroff, O.A., and Rothman, D.L. Measuring human brain GABA in vivo: effects of GABA-transaminase inhibition with vigabatrin. *Mol Neurobiol*, 16(1):97-121, 1998.
- Petroff, O.A.; Spencer, D.D.; Alger, J.R.; and Prichard, J.W. High-field proton magnetic resonance spectroscopy of human cerebrum obtained during surgery for epilepsy. *Neurology*, 39(9):1197-202, 1989.
- Phelps, E.A. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*, 14(2):198-202., 2004.
- Pitkanen, A., and Sutula, T.P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*, 1(3):173-81, 2002.
- Piotto M.; Moussalieh F.M.; Imperiale A.; Benahmed M.A.; Detour J.; Bellocq J.P.; Namer I.J.; Elbayed K. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by <sup>1</sup>H HRMAS NMR. In *Methodologies in metabolomics: experimental strategies and techniques for metabolomics research* (Ed. Lutz P.). Cambridge University Press, 2012.
- Pittau, F.; Grova, C.; Moeller, F.; Dubeau, F.; and Gotman, J. Patterns of altered functional connectivity in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 53(6):1013-23, 2012.
- Prabakaran, S.; Swatton, J.E.; Ryan, M.M.; Huffaker, S.J.; Huang, J.T.; Griffin, J.L.; Wayland, M.; Freeman, T.; Dudbridge, F.; Lilley, K.S.; Karp, N.A.; Hester, S.; Tkachev, D.; Mimmack, M.L.; Yolken, R.H.; Webster, M.J.; Torrey, E.F.; and Bahn, S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry*, 9(7):684-97, 643, 2004.
- Provencher, S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*, 30(6):672-9, 1993.
- Provencher, S.W. Automatic quantitation of localized in vivo <sup>1</sup>H spectra with LCModel. *NMR Biomed*, 14(4):260-4, 2001.
- Psychogios, N.; Hau, D.D.; Peng, J.; Guo, A.C.; Mandal, R.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Krishnamurthy, R.; Eisner, R.; Gautam, B.; Young, N.; Xia, J.; Knox, C.; Dong, E.; Huang, P.; Hollander, Z.; Pedersen, T.L.; Smith, S.R.; Bamforth, F.; Greiner, R.; McManus, B.; Newman, J.W.; Goodfriend, T.; and Wishart, D.S. The human serum metabolome. *PLoS One*, 6(2):e16957, 2011.
- Putri, S.P.; Nakayama, Y.; Matsuda, F.; Uchikata, T.; Kobayashi, S.; Matsubara, A.; and Fukusaki, E. Current metabolomics: Practical applications. *J Biosci Bioeng*, 115(6):579-89, 2013.
- Puts, N.A., and Edden, R.A. In vivo magnetic resonance spectroscopy of GABA: a methodological review. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 60:29-41, 2012.
- Quistorff B. Guillotine freeze clamping of rat brain. In Passoneau J.V., Hawkins R.A., Lust D.W., Welsh F.A. *Cerebral metabolism and neural function*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
- Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 32 (3); 281-94. 1972.
- Rasia-Filho, A.A.; Londero, R.G.; and Achaval, M. Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci*, 25(1):14-23, 2000.
- Ratcheson R.A. Funnel freezing for preservation of intermediary metabolites in rats. In Passoneau J.V., Hawkins R.A., Lust D.W., Welsh F.A. *Cerebral metabolism and neural function*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.

- Rehman, S.; Xu, Y.; Dunn, W.B.; Day, P.J.; Westerhoff, H.V.; Goodacre, R.; and Bayat, A. Dupuytren's disease metabolite analyses reveals alterations following initial short-term fibroblast culturing. *Mol Biosyst*, 8(9):2274-88, 2012.
- Risa, O.; Melo, T.M.; and Sonnewald, U. Quantification of amounts and (13)C content of metabolites in brain tissue using high-resolution magic angle spinning (13)C NMR spectroscopy. *NMR Biomed*, 22(3):266-71, 2009.
- Robertson, D.G. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci*, 85(2):809-22, 2005.
- Roch, C.; Leroy, C.; Nehlig, A.; and Namer, I.J. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia*, 43(4):325-35., 2002a.
- Roch, C.; Leroy, C.; Nehlig, A.; and Namer, I.J. Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia*, 43(10):1129-36, 2002b.
- Ross, B.D., and Bluml, S. New aspects of brain physiology. *NMR Biomed*, 9(7):279-96, 1996.
- Rothman, D.L.; De Feyter, H.M.; de Graaf, R.A.; Mason, G.F.; and Behar, K.L. 13C MRS studies of neuroenergetics and neurotransmitter cycling in humans. *NMR Biomed*, 24(8):943-57, 2011.
- Ryvlin, P.; Philippon, B.; Cinotti, L.; Froment, J.C.; Le Bars, D.; and Mauguiere, F. Functional neuroimaging strategy in temporal lobe epilepsy: a comparative study of 18FDG-PET and 99mTc-HMPAO-SPECT. *Ann Neurol*, 31(6):650-6, 1992.
- Salmenpera, T.; Kalviainen, R.; Partanen, K.; and Pitkanen, A. Quantitative MRI volumetry of the entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy. *Seizure*, 9(3):208-15, 2000.
- Salmenpera, T.; Kalviainen, R.; Partanen, K.; and Pitkanen, A. Hippocampal and amygdaloid damage in partial epilepsy: a cross-sectional MRI study of 241 patients. *Epilepsy Res*, 46(1):69-82, 2001.
- Scheau, C.; Preda, E.M.; Popa, G.A.; Gherghus, A.E.; Capsa, R.A.; and Lupescu, I.G. Magnetic resonance spectroscopy--a non-invasive method in evaluating focal and diffuse central nervous system disease. *J Med Life*, 5(4):423-7, 2012.
- Schneider, B., Daskocilova, D., & Pivcova, H. 1975. PROTON-MAGNETIC-RESONANCE SPECTRA OF HETEROGENEOUS SYSTEMS (APPLICATIONS OF MAGIC-ANGLE ROTATION). *Magnetic resonance in chemistry and biology: based on lectures at the Ampère International Summer School on Magnetic Resonance in Chemistry and Biology, Baško Polje, Yugoslavia, June 1971*, 127, 1975.
- Schousboe, A.; Westergaard, N.; Sonnewald, U.; Petersen, S.B.; Yu, A.C.; and Hertz, L. Regulatory role of astrocytes for neuronal biosynthesis and homeostasis of glutamate and GABA. *Prog Brain Res*, 94:199-211, 1992.
- Schramm, J. Temporal lobe epilepsy surgery and the quest for optimal extent of resection: a review. *Epilepsia*, 49(8):1296-307, 2008.
- Schramm, J.; Delev, D.; Wagner, J.; Elger, C.E.; and von Lehe, M. Seizure outcome, functional outcome, and quality of life after hemispherectomy in adults. *Acta Neurochir (Wien)*, 154(9):1603-12, 2012.
- Schuhmann, M.U.; Stiller, D.; Skardelly, M.; Bernarding, J.; Klinge, P.M.; Samii, A.; Samii, M.; and Brinker, T. Metabolic changes in the vicinity of brain contusions: a proton magnetic resonance spectroscopy and histology study. *J Neurotrauma*, 20(8):725-43, 2003.
- Serles, W.; Li, L.M.; Antel, S.B.; Cendes, F.; Gotman, J.; Olivier, A.; Andermann, F.; Dubeau, F.; and Arnold, D.L. Time course of postoperative recovery of N-acetyl-aspartate in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 42(2):190-7, 2001.
- Sharpless, N.S., and Brown, L.L. Use of microwave irradiation to prevent postmortem catecholamine metabolism: evidence for tissue disruption artifact in a discrete region of rat brain. *Brain Res*, 140(1):171-6, 1978.
- Shaw, C.A.; Bains, J.S.; Pasqualotto, B.A.; and Curry, K. Methionine sulfoximine shows excitotoxic actions in rat cortical slices. *Can J Physiol Pharmacol*, 77(11):871-7, 1999.
- Shen, J.; Petersen, K.F.; Behar, K.L.; Brown, P.; Nixon, T.W.; Mason, G.F.; Petroff, O.A.; Shulman, G.I.; Shulman, R.G.; and Rothman, D.L. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo 13C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14):8235-40, 1999.

- Sherwin, A.; Robitaille, Y.; Quesney, F.; Olivier, A.; Villemure, J.; Leblanc, R.; Feindel, W.; Andermann, E.; Gotman, J.; Andermann, F.; and et al. Excitatory amino acids are elevated in human epileptic cerebral cortex. *Neurology*, 38(6):920-3, 1988.
- Simister, R.J.; McLean, M.A.; Barker, G.J.; and Duncan, J.S. Proton MRS reveals frontal lobe metabolite abnormalities in idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*, 61(7):897-902, 2003.
- Simister, R.J.; McLean, M.A.; Barker, G.J.; and Duncan, J.S. Proton MR spectroscopy of metabolite concentrations in temporal lobe epilepsy and effect of temporal lobe resection. *Epilepsy Res*, 83(2-3):168-76, 2009.
- Simister, R.J.; Woermann, F.G.; McLean, M.A.; Bartlett, P.A.; Barker, G.J.; and Duncan, J.S. A short-echo-time proton magnetic resonance spectroscopic imaging study of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43(9):1021-31, 2002.
- Sonneward, U.; Westergaard, N.; Hassel, B.; Muller, T.B.; Unsgard, G.; Fonnum, F.; Hertz, L.; Schousboe, A.; and Petersen, S.B. NMR spectroscopic studies of <sup>13</sup>C acetate and <sup>13</sup>C glucose metabolism in neocortical astrocytes: evidence for mitochondrial heterogeneity. *Dev Neurosci*, 15(3-5):351-8, 1993.
- Spanedda, F.; Cendes, F.; and Gotman, J. Relations between EEG seizure morphology, interhemispheric spread, and mesial temporal atrophy in bitemporal epilepsy. *Epilepsia*, 38(12):1300-14, 1997.
- Spencer, D.D.; Spencer, S.S.; Mattson, R.H.; Williamson, P.D.; and Novelly, R.A. Access to the posterior medial temporal lobe structures in the surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Neurosurgery*, 15(5):667-71, 1984.
- Spencer, S.S., and Spencer, D.D. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 35(4):721-7, 1994.
- Spencer, S.S.; Theodore, W.H.; and Berkovic, S.F. Clinical applications: MRI, SPECT, and PET. *Magn Reson Imaging*, 13(8):1119-24, 1995.
- Squire, L.R.; Stark, C.E.; and Clark, R.E. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*, 27:279-306, 2004.
- Srivastava, S.; Kashiwaya, Y.; Chen, X.; Geiger, J.D.; Pawlosky, R.; and Veech, R.L. Microwave irradiation decreases ATP, increases free [Mg<sup>2+</sup>], and alters in vivo intracellular reactions in rat brain. *J Neurochem*, 123(5):668-75, 2012.
- Stefan, H., and Pauli, E. Progressive cognitive decline in epilepsy: an indication of ongoing plasticity. *Prog Brain Res*, 135:409-17, 2002.
- Steinhauser, C.; Seifert, G.; and Bedner, P. Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K<sup>+</sup> channels and gap junction coupling. *Glia*, 60(8):1192-202, 2012.
- Suhy, J.; Laxer, K.D.; Capizzano, A.A.; Vermathen, P.; Matson, G.B.; Barbaro, N.M.; and Weiner, M.W. <sup>1</sup>H MRSI predicts surgical outcome in MRI-negative temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 58(5):821-3, 2002.
- Suzuki, W.A., and Amaral, D.G. Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J Neurosci*, 14(3 Pt 2):1856-77., 1994.
- Tanriverdi, T.; Dudley, R.W.; Hasan, A.; Al Jishi, A.; Al Hinai, Q.; Poulin, N.; Colnat-Coulbois, S.; and Olivier, A. Memory outcome after temporal lobe epilepsy surgery: corticoamygdalohippocampectomy versus selective amygdalohippocampectomy. *J Neurosurg*, 113(6):1164-75, 2010.
- Tanriverdi, T., and Olivier, A. Cognitive changes after unilateral cortico-amygdalohippocampectomy unilateral selective-amygdalohippocampectomy mesial temporal lobe epilepsy. *Turk Neurosurg*, 17(2):91-9, 2007.
- Tanriverdi, T.; Olivier, A.; Poulin, N.; Andermann, F.; and Dubeau, F. Long-term seizure outcome after mesial temporal lobe epilepsy surgery: corticalamygdalohippocampectomy versus selective amygdalohippocampectomy. *J Neurosurg*, 108(3):517-24, 2008.
- Theodore, W.H.; Kelley, K.; Toczek, M.T.; and Gaillard, W.D. Epilepsy duration, febrile seizures, and cerebral glucose metabolism. *Epilepsia*, 45(3):276-9, 2004.



- Thom, M.; Liagkouras, I.; Martinian, L.; Liu, J.; Catarino, C.B.; and Sisodiya, S.M. Variability of sclerosis along the longitudinal hippocampal axis in epilepsy: a post mortem study. *Epilepsy Res*, 102(1-2):45-59, 2012.
- Thom, M.; Sisodiya, S.M.; Beckett, A.; Martinian, L.; Lin, W.R.; Harkness, W.; Mitchell, T.N.; Craig, J.; Duncan, J.; and Scaravilli, F. Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(6):510-9., 2002.
- Thom, M.; Toma, A.; An, S.; Martinian, L.; Hadjivassiliou, G.; Ratilal, B.; Dean, A.; McEvoy, A.; Sisodiya, S.M.; and Brandner, S. One hundred and one dysembryoplastic neuroepithelial tumors: an adult epilepsy series with immunohistochemical, molecular genetic, and clinical correlations and a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70(10):859-78, 2011.
- Timmerman, W., and Westerink, B.H. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*, 27(3):242-61, 1997.
- Trygg, J.; Holmes, E.; and Lundstedt, T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*, 6(2):469-79, 2007.
- Tsai, M.H.; Pardoe, H.R.; Perchyonok, Y.; Fitt, G.J.; Scheffer, I.E.; Jackson, G.D.; and Berkovic, S.F. Etiology of hippocampal sclerosis: Evidence for a predisposing familial morphologic anomaly. *Neurology*, 81(2):144-9, 2013.
- Turski, L.; Ikonomidou, C.; Turski, W.A.; Bortolotto, Z.A.; and Cavalheiro, E.A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3(2):154-71, 1989.
- Turski, W.A.; Cavalheiro, E.A.; Schwarz, M.; Czuczwar, S.J.; Kleinrok, Z.; and Turski, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 9(3):315-35., 1983.
- Tuunanen, J., and Pitkanen, A. Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Res*, 39(2):171-6, 2000.
- Urenjak, J.; Williams, S.R.; Gadian, D.G.; and Noble, M. Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro. *J Neurochem*, 59(1):55-61, 1992.
- Valentin, A.; Garcia-Seoane, J.J.; and Colino, A. Lithium enhances synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *Neuroscience*, 78(2):385-91., 1997.
- van der Hel, W.S.; van Eijdsden, P.; Bos, I.W.; de Graaf, R.A.; Behar, K.L.; van Nieuwenhuizen, O.; de Graan, P.N.; and Braun, K.P. In vivo MRS and histochemistry of status epilepticus-induced hippocampal pathology in a juvenile model of temporal lobe epilepsy. *NMR Biomed*, 26(2):132-40, 2013.
- van Eijdsden, P.; Notenboom, R.G.; Wu, O.; de Graan, P.N.; van Nieuwenhuizen, O.; Nicolay, K.; and Braun, K.P. In vivo <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy, T2-weighted and diffusion-weighted MRI during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in the rat. *Brain Res*, 1030(1):11-8, 2004.
- Van Gelder, N.M.; Sherwin, A.L.; and Rasmussen, T. Amino acid content of epileptogenic human brain: focal versus surrounding regions. *Brain Res*, 40(2):385-93, 1972.
- Van Paesschen, W.; King, M.D.; Duncan, J.S.; and Connelly, A. The amygdala and temporal lobe simple partial seizures: a prospective and quantitative MRI study. *Epilepsia*, 42(7):857-62, 2001.
- Van Paesschen, W.; Revesz, T.; Duncan, J.S.; King, M.D.; and Connelly, A. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 42(5):756-66, 1997.
- van Zijl, P.C., and Rothman, D. NMR studies of brain <sup>13</sup>C-glucose uptake and metabolism: present status. *Magn Reson Imaging*, 13(8):1213-21, 1995.
- Veech R.L. Freeze-Blowing of Brain and the interpretation of the meaning of certain metabolite levels. In Passoneau J.V., Hawkins R.A., Lust D.W., Welsh F.A. Cerebral metabolism and neural function. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
- Vermathen, P.; Ende, G.; Laxer, K.D.; Knowlton, R.C.; Matson, G.B.; and Weiner, M.W. Hippocampal N-acetylaspartate in neocortical epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 42(2):194-9, 1997.

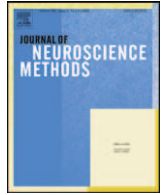
- Vermathen, P.; Ende, G.; Laxer, K.D.; Walker, J.A.; Knowlton, R.C.; Barbaro, N.M.; Matson, G.B.; and Weiner, M.W. Temporal lobectomy for epilepsy: recovery of the contralateral hippocampus measured by (1)H MRS. *Neurology*, 59(4):633-6, 2002.
- Vermathen, P.; Laxer, K.D.; Matson, G.B.; and Weiner, M.W. Hippocampal structures: anteroposterior N-acetylaspartate differences in patients with epilepsy and control subjects as shown with proton MR spectroscopic imaging. *Radiology*, 214(2):403-10, 2000.
- Vielhaber, S.; Niessen, H.G.; Debska-Vielhaber, G.; Kudin, A.P.; Wellmer, J.; Kaufmann, J.; Schonfeld, M.A.; Fendrich, R.; Willker, W.; Leibfritz, D.; Schramm, J.; Elger, C.E.; Heinze, H.J.; and Kunz, W.S. Subfield-specific loss of hippocampal N-acetyl aspartate in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 49(1):40-50, 2008.
- Vielhaber, S.; Von Oertzen, J.H.; Kudin, A.F.; Schoenfeld, A.; Menzel, C.; Biersack, H.J.; Kral, T.; Elger, C.E.; and Kunz, W.S. Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 44(2):193-9, 2003.
- Villas-Boas, S.G., and Bruheim, P. Cold glycerol-saline: the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells. *Anal Biochem*, 370(1):87-97, 2007.
- Vinton, A.B.; Carne, R.; Hicks, R.J.; Desmond, P.M.; Kilpatrick, C.; Kaye, A.H.; and O'Brien, T.J. The extent of resection of FDG-PET hypometabolism relates to outcome of temporal lobectomy. *Brain*, 130(Pt 2):548-60, 2007.
- Violante, I.R.; Anastasovska, J.; Sanchez-Canon, G.J.; Rodrigues, T.B.; Righi, V.; Nieto-Charques, L.; Parkinson, J.R.; Bloom, S.R.; Bell, J.D.; and Cerdan, S. Cerebral activation by fasting induces lactate accumulation in the hypothalamus. *Magn Reson Med*, 62(2):279-83, 2009.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6(8):626-40, 2005.
- von Lehe, M.; Lutz, M.; Kral, T.; Schramm, J.; Elger, C.E.; and Clusmann, H. Correlation of health-related quality of life after surgery for mesial temporal lobe epilepsy with two seizure outcome scales. *Epilepsy Behav*, 9(1):73-82, 2006.
- Waldbaum, S., and Patel, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 88(1):23-45, 2010.
- Walenta, S.; Schroeder, T.; and Mueller-Klieser, W. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem*, 11(16):2195-204, 2004.
- Wang, Y.; Wang, Y.; Li, M.; Xu, P.; Gu, T.; Ma, T.; and Gu, S. (1)H NMR-based metabolomics exploring biomarkers in rat cerebrospinal fluid after cerebral ischemia/reperfusion. *Mol Biosyst*, 9(3):431-9, 2013.
- Wasinger, V.C.; Cordwell, S.J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, J.X.; Gooley, A.A.; Wilkins, M.R.; Duncan, M.W.; Harris, R.; Williams, K.L.; and Humphery-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16(7):1090-4, 1995.
- Wellard, R.M.; Briellmann, R.S.; Prichard, J.W.; Syngeniotes, A.; and Jackson, G.D. Myoinositol abnormalities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 44(6):815-21, 2003.
- Wendling, A.S.; Hirsch, E.; Wisniewski, I.; Davanture, C.; Ofer, I.; Zentner, J.; Bilic, S.; Scholly, J.; Staack, A.M.; Valenti, M.P.; Schulze-Bonhage, A.; Kehrl, P.; and Steinhoff, B.J. Selective amygdalohippocampectomy versus standard temporal lobectomy in patients with mesial temporal lobe epilepsy and unilateral hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*, 104(1-2):94-104, 2013.
- Wennberg, R.; Arruda, F.; Quesney, L.F.; and Olivier, A. Preeminence of extrahippocampal structures in the generation of mesial temporal seizures: evidence from human depth electrode recordings. *Epilepsia*, 43(7):716-26, 2002.
- Westergaard, N.; Varming, T.; Peng, L.; Sonnewald, U.; Hertz, L.; and Schousboe, A. Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res*, 35(5):540-5, 1993.
- Wetherington, J.; Serrano, G.; and Dingledine, R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*, 58(2):168-78, 2008.
- Wiebe, S.; Blume, W.T.; Girvin, J.P.; and Eliasziw, M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med*, 345(5):311-8, 2001.

- Wieser, H.G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, 45(6):695-714, 2004.
- Willmann, O.; Wennberg, R.; May, T.; Woermann, F.G.; and Pohlmann-Eden, B. The role of 1H magnetic resonance spectroscopy in pre-operative evaluation for epilepsy surgery. A meta-analysis. *Epilepsy Res*, 71(2-3):149-58, 2006.
- Wishart, D.S. Human Metabolome Database: completing the 'human parts list'. *Pharmacogenomics*, 8(7):683-6, 2007.
- Wishart, D.S.; Jewison, T.; Guo, A.C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Arndt, D.; Xia, J.; Liu, P.; Yallou, F.; Bjorn Dahl, T.; Perez-Pineiro, R.; Eisner, R.; Allen, F.; Neveu, V.; Greiner, R.; and Scalbert, A. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue):D801-7, 2013.
- Witter, M.P.; Wouterlood, F.G.; Naber, P.A.; and Van Haeften, T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci*, 911:1-24., 2000.
- Woermann, F.G.; McLean, M.A.; Bartlett, P.A.; Parker, G.J.; Barker, G.J.; and Duncan, J.S. Short echo time single-voxel 1H magnetic resonance spectroscopy in magnetic resonance imaging-negative temporal lobe epilepsy: different biochemical profile compared with hippocampal sclerosis. *Ann Neurol*, 45(3):369-76, 1999.
- Wold, S. Chemometrics, why, what and where to next? *J Pharm Biomed Anal*, 9(8):589-96, 1991.
- Wold, S.; Hellberg, S.; and Dunn, W.J., 3rd. Computer methods for the assessment of toxicity. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 52 Suppl 2:158-89, 1983.
- Wyler, A.R.; Hermann, B.P.; and Richey, E.T. Results of reoperation for failed epilepsy surgery. *J Neurosurg*, 71(6):815-9, 1989.
- Wyler, A.R.; Hermann, B.P.; and Somes, G. Extent of medial temporal resection on outcome from anterior temporal lobectomy: a randomized prospective study. *Neurosurgery*, 37(5):982-90; discussion 990-1, 1995.
- Yang, Y.; Chen, L.; Gao, H.; Zeng, D.; Yue, Y.; Liu, M.; Lei, H.; Deng, F.; and Ye, C. High-resolution magic-angle spinning (13)C spectroscopy of brain tissue at natural abundance. *Magn Reson Chem*, 44(3):263-8, 2006.
- Yasargil, M.G.; Wieser, H.G.; Valavanis, A.; von Ammon, K.; and Roth, P. Surgery and results of selective amygdala-hippocampectomy in one hundred patients with nonlesional limbic epilepsy. *Neurosurg Clin N Am*, 4(2):243-61, 1993.
- Yilmazer-Hanke, D.M.; Wolf, H.K.; Schramm, J.; Elger, C.E.; Wiestler, O.D.; and Blumcke, I. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(10):907-20, 2000.
- Weber M. Histoire de la chirurgie de l'épilepsie : des origines au MNI. *Epilepsies Vol 19 2*, 2007.
- Zarow, C.; Sitzer, T.E.; and Chui, H.C. Understanding hippocampal sclerosis in the elderly: epidemiology, characterization, and diagnostic issues. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 8(5):363-70, 2008.

# ANNEXE 1

PUBLICATION n°1

**Detour, J.;** Elbayed, K.; Piotto, M.; Moussallieh, F.M.; Nehlig, A.; and Namer, I.J. Ultrafast in vivo microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J Neurosci Methods*, 201(1):89-97, 2011.



## Ultra fast *in vivo* microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis

J. Detour<sup>a,b,\*</sup>, K. Elbayed<sup>c</sup>, M. Piotto<sup>c,d</sup>, F.M. Moussallieh<sup>a,c</sup>, A. Nehlig<sup>e</sup>, I.J. Namer<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Biophysics and Nuclear Medicine Department, Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France

<sup>b</sup> LINC, University of Strasbourg/CNRS FRE 3289, Faculty of Medicine, Institut de Physique Biologique, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg Cedex, France

<sup>c</sup> Institut de Chimie, University of Strasbourg/CNRS UMR 7177, 4 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg Cedex, France

<sup>d</sup> Bruker BioSpin, 34 rue de l'industrie, 67166 Wissembourg, France

<sup>e</sup> INSERM U666, University of Strasbourg; Faculty of Medicine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 April 2011

Received in revised form 11 July 2011

Accepted 14 July 2011

#### Keywords:

HRMAS

NMR

Microwaves

Metabolites

Brain

Tissue fixation

### ABSTRACT

High resolution magic-angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy is a well established technique for *ex vivo* metabolite investigations but experimental factors such as ischemic delay or mechanical stress due to continuous spinning deserve further investigations. Cortical brain samples from rats that underwent ultrafast *in vivo* microwave irradiation (MWp group) were compared to similar samples that underwent standard nitrogen freezing with and without exposure to domestic microwaves (FN and FN + MWd groups). One dimensional <sup>1</sup>H HRMAS NMR spectra were acquired and 16 metabolites of interest were quantified. Within each group 3 samples underwent long lasting acquisition (up to 15 h). Statistically significant differences in metabolite concentrations were observed between groups for metabolites associated to post mortem biochemical changes and/or anaerobic glycolysis including several neurotransmitters. Spectral assessment over time showed a drastic reduction of biochemical variations in both MW groups. Only 2/16 metabolites exhibited significant signal variations after 15 h of continuous spinning and acquisition in the MWp group. This number increased to 10 in the FN group. We confirmed limited anaerobic metabolism and post mortem degradation after ultra fast *in vivo* MW irradiation. Furthermore, spectra obtained after MWp and MWd irradiation exhibited an extremely stable spectral pattern over extended periods of continuous acquisition.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

High resolution magic-angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy is able to provide metabolic information on biological systems using physically heterogeneous biopsy samples. In the neurometabolic field HRMAS NMR is a well established technique for *ex vivo* metabolite identification and quantification. Nonetheless, to achieve optimal experimental conditions, methodological issues such as sample collection, fixation methods, insert preparation or tissue alteration during an extended period of continuous spectral acquisition deserve further studies.

Investigations of cerebral metabolism require proper fixation procedures. Efficient freezing techniques have been described such as freeze-blowing (Veech et al., 1973) or funnel-freezing (Pontén et al., 1973). At the moment, the vast majority of laboratories uses instant freezing in liquid nitrogen to inactivate the metabolism

of resected tissue prior to HRMAS acquisition while only a few teams use pulsed microwaves (Risa et al., 2009; Violante et al., 2009). Unfortunately nitrogen freezing does not completely avoid the initiation of ischemic metabolism. A short delay is required to insure freezing within the core of the sample. This delay is relatively long for whole brain fixation as usually performed for neurometabolic animal studies (decapitation immediately followed by snap freezing in liquid nitrogen). The kinetics of ischemic metabolism initiation after resection are known to be tissue dependent and represent a critical issue regarding brain metabolism (Lust et al., 1980; Waters et al., 2000). The brain has a high metabolic rate that requires a continuous supply of glucose and oxygen. Any interruption in the supply of nutrients results in rapid changes of brain metabolites. Rapid post mortem changes have been described in levels of neurotransmitters, cyclic nucleotides, amino acids and intermediary metabolites (Sharpless and Brown, 1978). Using HRMAS NMR, Opstad et al. (2008) recently reported biochemical changes occurring after various delays of ischemia compared to cerebral funnel-freezing. As expected, these authors observed variations in labile metabolite concentrations associated with anaerobic glycolysis such as alanine or lactate. The use of microwave (MW) irradiation to rapidly inactivate brain enzymes

\* Corresponding author at: Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Biophysique et Médecine Nucléaire, Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France. Tel.: +33 03 88 12 78 25; fax: +33 03 88 12 78 10.

E-mail address: [Julien.DETOUR@chru-strasbourg.fr](mailto:Julien.DETOUR@chru-strasbourg.fr) (J. Detour).

was already reported in the 1970s (Stavinoha et al., 1973). Ultra fast *in vivo* microwave fixation preserves cellular structures with minimal alteration of cellular biochemistry (Ainley and Ironside, 1994). Nowadays microwave devices deliver pulsed microwaves (typically 5–10 kW) that are able to transiently elevate brain temperature to 80–90 °C during less than 2 s. This leads to a permanent inactivation of enzymes, thereby minimizing enzyme-dependent post-mortem metabolic changes. This technique is now regarded as a reference method for brain metabolism inactivation by several groups in the NMR neurometabolic field (Risa et al., 2009; Violante et al., 2009; De Graaf et al., 2009). Although such issues have been extensively studied in the 1970s, they remain understudied by HRMAS NMR.

Another critical methodological issue regarding HRMAS NMR experiments deals with acquisition conditions. Schematically *in situ* biochemical variations during HRMAS NMR acquisition are dependent on tissue sample, temperature, spinning rate and experimental duration (Waters et al., 2000; Burns et al., 2005; Taylor et al., 2003; Wu et al., 2003). Opstad et al. (2008) suggested that extended spinning periods during acquisition might be the major driving factor for *in situ* biochemical variations. According to this team, tissue ischemia during biopsy excision and delay in snap-freezing may have less significant effects on metabolite profile than prolonged spinning times. The authors evoked an element of mechanical damage that may explain some of these biochemical changes. In particular, total creatine increased in an asymptotic exponential manner that suggested the release of previously NMR-invisible bound creatine due to mechanical stress. Prolonged spinning times are required for two-dimensional HRMAS NMR acquisition. Extended periods of spinning are also required when performing *ex vivo* <sup>13</sup>C HRMAS NMR spectroscopy after infusion of <sup>13</sup>C labeled substrates. Hence for HRMAS NMR, the question remains on how biochemical changes induced by extended periods of mechanical stress upon biopsy samples could be limited by the use of appropriate fixation methods.

The first objective of the present study was to compare <sup>1</sup>H NMR spectra obtained on cerebral biopsies using nitrogen freezing and ultra fast *in vivo* MW fixation to confirm the advantages of the latter technique for HRMAS NMR analysis. Such an experiment may also contribute to identify metabolite artifacts induced by the ischemic delay when freezing in liquid nitrogen is used. The second objective was to assess the NMR signal stability over an extended period of continuous HRMAS acquisition (up to 15 h) for biopsy samples obtained with these two fixation techniques. We finally added a group of animals that underwent immediate nitrogen freezing followed by microwave irradiation in a domestic microwave oven to confirm the effect of previous samples heating upon NMR signal stability during long HRMAS NMR acquisition.

## 2. Methods

### 2.1. Tissue collection and sample preparation

Twenty adults male Wistar rats were selected for the study (weight ~250–300 g). The animals were maintained at room temperature (22 °C) under a 12-h/12-h normal light/dark cycle (light on at 7:00 a.m.) with food and water *ad libitum*. All animal experimentations were performed in accordance with the rules of the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (License N° 67/97, AN). Six rats were subjected to ultra fast *in vivo* microwave fixation (MWp group) using a dedicated device with focused head beam (4 kW, 2.45 GHz, 1.8 s, Püschner GmbH, Schwanebeck, Germany). The delivery of high output and pulsed microwaves kills the animal instantaneously (MWp group). Fourteen rats under-

went instant neck dislocation, followed by decapitation and the heads were immediately snap frozen in liquid nitrogen. No surgical procedure or anesthetic medications were applied before sacrifice. Then, the brains were taken out of the skull, put on ice and regions of interest (ROIs) were punched out in order to prepare inserts. In seven of these 14 rats, ROIs were punched out without any additional treatment (FN group) while the other seven rat brain samples, were placed into a domestic microwave oven during 20 s with an energy output of 850 W (Whirlpool, Benton Harbour, USA; FN + MWd group).

For each animal, two biopsy samples from the frontal cortex were introduced into a 30 µL Kelf insert (weight 15–20 mg). To provide a lock frequency, 10 µL of D<sub>2</sub>O were added to the insert. The insert insures that the entire biopsy is detected by the radio-frequency coil of the probe and that no leaks occur during the HRMAS analysis. The inserts containing the biopsy were then stored at –80 °C. Shortly before the HRMAS analysis, the insert was placed into a standard 4 mm ZrO<sub>2</sub> rotor and closed with a cap. The ensemble was then inserted into a HRMAS probe. The rotor preparation followed the procedure reported by our research group (Piotto et al., 2008). A total number of 14 inserts were obtained for the FN group, 14 for the FN + MWd group and 9 for the MWp group. HRMAS <sup>1</sup>H NMR spectra were acquired for these samples. Among each group 3 samples underwent a NMR signal stability assay over time.

### 2.2. Data acquisition

HRMAS spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The spectrometer is equipped with a 4 mm double resonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit is used to regulate the temperature at 4 °C by cooling down the bearing air flowing into the probe. All NMR experiments were conducted on samples spinning at 3502 Hz to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest.

For each biopsy sample, a one-dimensional proton spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence was acquired as previously reported (Piotto et al., 2008). The inter-pulse delay between the 180° pulses of the CPMG pulse train was synchronized with the sample and set to 285 µs ( $1/\omega = 1/3502 = 285 \mu\text{s}$ ) to eliminate signal losses due to B<sub>1</sub> inhomogeneities (Elbayed et al., 2005; Piotto et al., 2001). The number of loops was set to 328 giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms. Parameters for the CPMG experiment were: sweep width 14.2 ppm, number of points 32 k, relaxation delay 2 s and acquisition time 2.3 s. A total of 128 FID were acquired resulting in an acquisition time of 10 min. All spectra were recorded in such a manner that only a zero phase order correction was necessary to properly phase the spectrum. The FID was multiplied by an exponential weighing function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were processed using automated baseline correction routines. Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm. Signal stability assay over time within each sample used the above described parameter according to the following sequence of acquisition: 1D acquisition every 10 min during the first 2 h and then at 4, 6, 12 and 15 h (16 acquisitions per sample, total of 96 spectra).

### 2.3. Metabolite quantification

Quantification was performed for 16 metabolites using an external reference standard of lactate. Spectra were normalized according to sample weight. Peaks of interest were automatically defined by an in house program using MATLAB 7.0 (Mathworks, Natick, United States). Peak integration was then compared to the

one obtained with the lactate reference and were corrected according to the number of protons. Results were expressed in  $\text{nmol mg}^{-1}$  of tissue. Chemical shifts for regions of interest were adapted from the work reported by Martinez-Bisbal et al. (2004). For each metabolite, the region of interest and proton number (according to the chemical function) were defined as follows: acetate (Ac; [1.918; 1.927],  $\text{CH}_3$ ), alanine (Ala; [1.459; 1.497],  $\beta\text{CH}_3$ ), aspartate (Asp; [2.760; 2.85],  $\beta\text{CH}_2$ ), choline (Cho; [3.193; 3.207],  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), creatine (Cr; [3.921; 3.941],  $\text{CH}_2$ ),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA; [2.268; 2.319],  $\text{CH}_2$ ), glutamine (Gln; [2.418; 2.465],  $\gamma\text{CH}_2$ ), glutamate (Glu; [2.037; 2.080],  $\beta\text{CH}_2$ ), glycine (Gly; [3.553; 3.568],  $\alpha\text{CH}$ ), lactate (Lac; [1.305; 1.350],  $\text{CH}_3$ ), myo-inositol (mIns; [3.517; 3.552], C1H, C3H), N-acetylaspartate (NAA; [2.006; 2.029],  $\text{CH}_3$ ), phosphocholine (PCho; [3.213; 3.228],  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), phosphocreatine (PCr; [3.945; 3.958],  $\text{CH}_2$ ), taurine (Tau; [3.401; 3.447],  $\text{CH}_2\text{-SO}_3$ ), valine (Val; [1.025; 1.061],  $\gamma\text{CH}_3$ ).

#### 2.4. Data analysis

For inter-group analysis, concentrations in  $\text{nmol mg}^{-1}$  of tissue were compared using an ANOVA across groups followed by Fischer post-hoc tests as appropriate. For intra-group analysis, values were analyzed using a non-parametric test because the number of samples (3 in each group) was low and the variances were not equal. Thus, a Friedmann test was used for within groups' comparisons, followed by a post hoc modified Mann–Whitney *U*-test.

Two types of principal component analyses (PCA) were also performed. Such analysis was already detailed by our research group (Piotto et al., 2008). For the first PCA, spectral region between 4.7 and 0.5 ppm of each 1D CMPC NMR spectrum was automatically binned into regions of 0.01 ppm using the AMIX 3.8 software (Bruker GmbH, Germany). Each 0.01 ppm region was computed and normalized according to the total integral of the spectrum. This process generated a *X*-matrix containing the chemical shifts as columns (421*X* variables) and each tissue sample as rows. This *X* matrix was analyzed using PCA. The robustness of the PCA model was assessed using  $R^2X$  (the fraction of the sum of squares of all the *X*s explained by the component) and the goodness of fit evaluated by  $Q^2$  (the fraction of the total variation of the *X*s that can be predicted by a component as estimated by cross-validation).  $Q^2$  is computed as  $(1 - \text{PRESS}/\text{SS})$  where PRESS is the predicted squared sum of error and represents the squared differences between observed and predicted values and SS is the residual sum of squares. Since the number of samples is relatively small regarding the number of variables from binned spectra, an extensive cross-validation of the analysis is mandatory to avoid overfitting of the data. The maximum theoretical value for  $Q^2$  is equal to 1 for a perfect prediction. A  $Q^2$  value superior to 0.5 is generally considered as a good predictor. Actually parameters are estimated on one part of the matrix and the goodness of the parameters tested in terms of their success in the prediction of another part of the matrix. Data sets were analyzed within the software package SIMCA P (Umetrics AB, Umea, Sweden). A second PCA was performed the same way excepted that instead of integrating region between 4.7 and 0.5 ppm, only the 16 metabolites regions of interest were retained (regions are mentioned in Section 2.3).

### 3. Results

#### 3.1. Metabolomics at the time of specimen collection ( $t = 10$ min)

Fig. 1 reports examples of NMR spectra after different acquisition times (one sample for each group after 10 min, 1 h, 4 h and 15 h of continuous acquisition, respectively). A qualitative comparison of spectral profiles between nitrogen frozen samples (FN

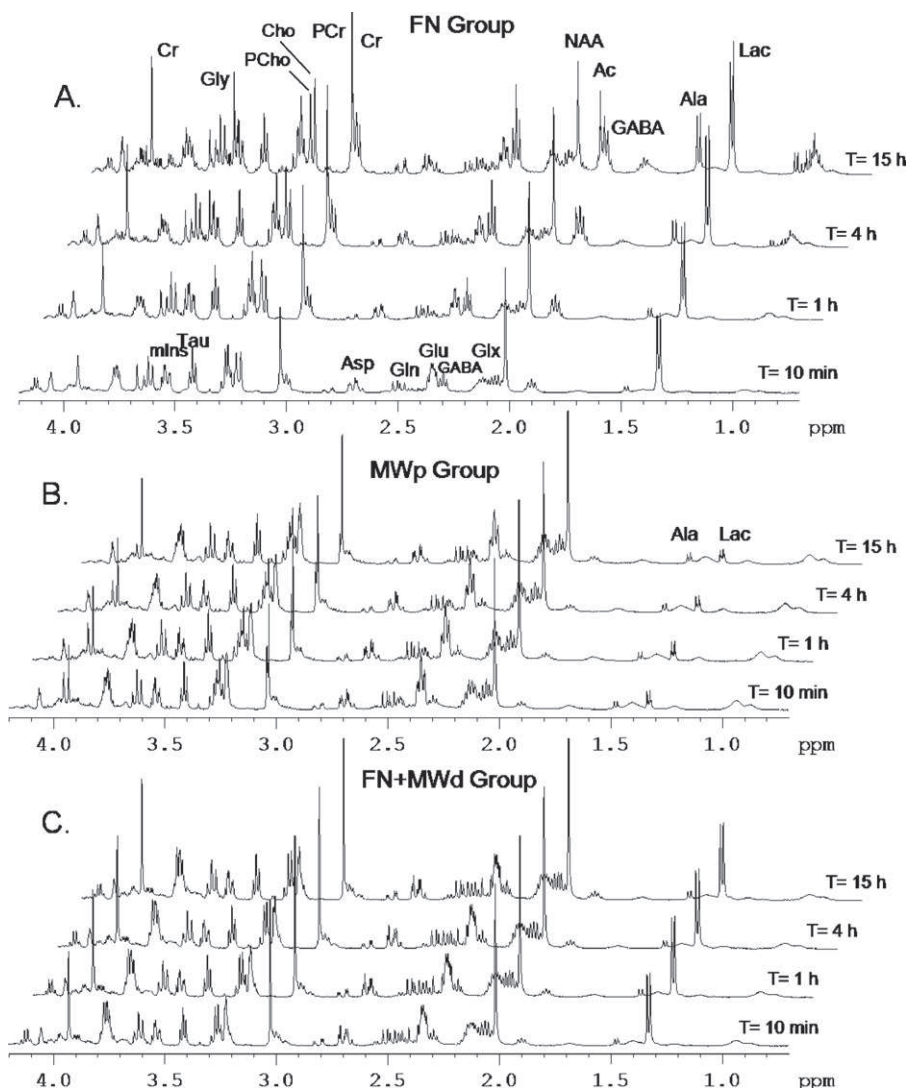
group) and pulsed microwave irradiated animals (MWp group) shows significant differences after 10 min of continuous acquisition. Quantitative values after the same acquisition time are summarized in Table 1. One striking result was the difference in Lac levels. Lac was largely reduced in the MWp group compared to the FN group. In the same way, PCr levels were reduced by 82% in the FN group. Concentration of these two metabolites in the FN + MWd group was not significantly different compared to the FN group. After a 10 min acquisition period, significant differences were observed for Ala, Asp, Cho, GABA, Gln, Glu, Lac, mIns, NAA, PCho, PCr between the FN and MWp groups. No significant variations were observed for Ac, Cr, Gly, Tau, Val. A principal component analysis (PCA) performed on spectra acquired after 10 min is reported in the scatter plot of Fig. 2. This figure illustrates the first two components based on the whole NMR spectra (0.5–4.7 ppm; left panel) or on specific regions corresponding to the 16 metabolites studied (right panel). Fig. 2A and B represents a PCA analysis that included all groups, Fig. 2C–H represents a group by group analysis. For each model only the first two components were included.  $R^2X$  and  $Q^2$  values were:  $R^2X = 0.504$ ,  $Q^2 = 0.427$  for Fig. 2A;  $R^2X = 0.584$ ,  $Q^2 = 0.404$  for Fig. 2B;  $R^2X = 0.83$ ,  $Q^2 = 0.80$  for Fig. 2C;  $R^2X = 0.89$ ,  $Q^2 = 0.80$  for Fig. 2D;  $R^2X = 0.524$ ,  $Q^2 = 0.375$  for Fig. 2E;  $R^2X = 0.513$ ,  $Q^2 = 0.354$  for Fig. 2F;  $R^2X = 0.440$ ,  $Q^2 = 0.237$  for Fig. 2G;  $R^2X = 0.458$ ,  $Q^2 = 0.217$  for Fig. 2H. Results reported for Fig. 2C and D showed that these models were able to convincingly separate the FN from the MWp group ( $Q^2 > 0.5$ ). For the other models, the first two components were barely able to separate groups but not as significantly as for Fig. 2C and D since  $Q^2$  values were never superior to 0.5.

#### 3.2. Signal stability over time

As depicted in Fig. 1, spectra from the MWp group were relatively constant throughout the acquisition period compared to those of the FN group even after several hours of continuous spinning (the same was observed to a lesser extent for the FN + MWd group). For example, signals associated to Ac and NAA were much more stable in the MWp group than in the FN group after 4 h of continuous spinning. Visually, several metabolite signals seemed to increase or decrease more largely over time in the FN group, whereas a more stable pattern was observed in the MWp and FN + MWd groups (i.e. Ac, Ala, NAA, Gly, mIns, PCho).

Metabolite concentration changes over time during continuous HRMAS experiments (up to 15 h of spinning) are represented in Fig. 3. In the FN group, almost every metabolite signal tended to increase during acquisition, whereas most metabolite concentration tended to remain stable over time in the MWp and FN + MWd groups. Only PCr in the MWp group and NAA in the FN group tended to decrease. In the FN + MWd group most metabolite concentrations exhibited a pattern similar to that obtained in the MWp group (Ac, Ala, Asp, Cho, GABA, Gly, PCho, PCr, Tau and Val) although some metabolites increased over time (Cr, Gln, Glu, Lac). In addition, in the FN + MWd group, Cr, Gln, and Lac concentrations followed a pattern quite similar to that of the FN group (Fig. 3).

To assess NMR signal stability over time, we performed intra-groups comparisons. Table 2 reports the statistically significant changes within each group after 1 h, 4 h and 15 h compared to the first acquisition. The number of statistically significant changes in metabolite concentration in the FN group increased over time: 3 metabolites after 1 h (GABA, Gln, Gly), 5 after 4 h (Ala, mIns), most metabolites after 15 h (except Cho, Glu, NAA, PCr and Tau). In the MWp group, only the signal of Cr and PCr changed significantly after 1 h and 4 h, respectively. Only those two metabolites exhibited statistically significant signal changes after 15 h of continuous spinning in the MWp group. The number of significant metabolite concentrations changes in the FN + MWd group went from 2 after 1 h (Gln, Lac) to 4 after 4 h (+Cr, Glu) and 6 after 15 h (+mIns, NAA).



**Fig. 1.** Stability pattern of HRMAS  $^1\text{H}$  NMR spectra over time after simple nitrogen freezing (A, FN group), after ultra fast MW irradiation (B, MWp group) and after nitrogen freezing and domestic MW irradiation (C, FN+MWd group). For each group represented spectra were acquired after 10 min, 1 h, 4 h and 15 h of continuous spinning. *Abbreviations:* Ac, acetate; Ala, alanine; Asp, aspartate; Cho, choline; Cr, creatine; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Glx, glutamate + glutamine; Gly, glycine; Lac, lactate; mIns, myo-inositol; NAA, N-acetylaspartate; PCho, phosphorylcholine; PCr, phosphocreatine; Tau, taurine; Val, valine.

The scatter plot from the PCA analysis is represented in Fig. 4. This analysis was performed on all spectra acquired over time for each group. The left panel is based on whole NMR spectra (0.5–4.7 ppm) while the right panel is based on specific spectral regions from the 16 metabolites studied. In both cases, the first two components of the PCA were able to separate convincingly the groups over time using an unsupervised multivariate data analysis. For each model, the PCA analysis was characterized by the following parameters: (Fig. 4A)  $R^2X=0.769$ ,  $Q^2=0.758$ ; (Fig. 4B)  $R^2X=0.693$ ,  $Q^2=0.640$ ; (Fig. 4C)  $R^2X=0.741$ ,  $Q^2=0.730$ ; (Fig. 4D)  $R^2X=0.654$ ,  $Q^2=0.627$ ; (Fig. 4E)  $R^2X=0.617$ ,  $Q^2=0.600$ ; (Fig. 4F)  $R^2X=0.570$ ,  $Q^2=0.528$ . PCA was able not only to convincingly separate biopsy samples according to their fixation method but also to represent the large dispersion of the signals acquired over time for a single biopsy in the FN group compared to the relatively narrow dispersion for biopsies from both MW groups.

#### 4. Discussion

Our study assesses the efficiency of ultra fast *in vivo* MW irradiation on samples prepared for HRMAS NMR analysis. We report

two major advantages of such procedure: (i) limitation of ischemic metabolism initiation; (ii) long term fixation properties of *in vivo* MW on rat brain samples even in relatively stringent conditions of spinning.

The first striking result comes from metabolite signals associated to ischemia or post mortem degradation. The concentration of some labile metabolites was much lower in the MWp group than in the FN group. This was the case of Ala, Lac and PCr that have been associated with the initiation of post mortem metabolism mainly due to anaerobic glycolysis. The low level of PCr in the FN group may confirm the breakdown of this compound during the early phase of ischemia to maintain ATP at a constant level (Lust et al., 1980). Almost no Lac could be found in the samples from the MWp group compared to the FN group. Likewise, GABA remained stable in the MWp group over time while it increased in the FN group. This is in accordance with previous data showing that GABA increases in a few minutes after rodent decapitation as a result of the activity of the glutamic acid decarboxylase pathway (Geddes et al., 1999). Moreover, the increase of GABA has been reported in autaptic brain tissues compared to fresh human biopsy samples (Knörle et al., 1997). This first comparison highlights the advantage



**Table 1**

Intergroups comparisons of metabolites concentrations at the time of tissue collection (after 10 min of acquisition).

Metabolite	Concentration (nmol mg <sup>-1</sup> tissue) (±SD)			
	FN group (n = 13)	MWp group (n = 9)	FN + MWd group (n = 8)	MWp vs FN + MWd value
Acetate	0.24 ± 0.06	0.39 ± 0.31	0.16 ± 0.01	0.027
Alanine	0.47 ± 0.05	0.80 ± 0.27**	0.68 ± 0.03#	NS
Aspartic acid	1.58 ± 0.53	2.41 ± 0.37**	2.22 ± 0.12##	NS
Choline	0.57 ± 0.18	0.30 ± 0.10**	0.31 ± 0.01##	NS
Creatine	4.16 ± 0.56	3.93 ± 1.01	5.08 ± 0.38#	0.005
GABA	2.63 ± 0.41	3.15 ± 0.63*	3.63 ± 0.07##	0.0036
Glutamine	2.38 ± 0.30	3.31 ± 0.68**	4.57 ± 0.27##	<0.001
Glutamate	7.21 ± 1.16	9.65 ± 1.04**	9.74 ± 0.36##	NS
Glycine	1.89 ± 0.34	1.81 ± 0.94	1.37 ± 0.09	NS
Lactate	4.85 ± 0.48	1.90 ± 0.64**	5.06 ± 0.22	<0.001
myo-Inositol	5.21 ± 0.49	4.14 ± 0.54**	4.51 ± 0.17#	NS
NAA	4.77 ± 0.52	5.42 ± 0.62*	5.74 ± 0.27##	NS
Phosphocholine	0.68 ± 0.10	0.93 ± 0.25*	1.14 ± 0.02##	0.009
Phosphocreatine	0.25 ± 0.06	1.18 ± 0.63**	0.15 ± 0.02	<0.001
Taurine	5.02 ± 1.03	4.27 ± 0.66	4.63 ± 0.26	NS
Valine	0.008 ± 0.07	0.094 ± 0.11	0.06 ± 0.01##	<0.001

Metabolite concentration (nmol mg<sup>-1</sup> of tissue) measured by HR-MAS <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in cortical biopsy samples from Wistar rats after nitrogen freezing (FN group), after prior ultra fast *in vivo* MW irradiation (MW group) and after nitrogen freezing and exposure to domestic microwaves (FN + MWd). Results are presented as means ± SD.

\* Statistical significance difference between the FN group and the MWp group at  $p < 0.05$  (post hoc Fischer test).

\*\* Statistical significance difference between the FN group and the MWp group at  $p < 0.001$  (post hoc Fischer test).

# Statistical significance difference between the FN group and the FN + MWd group at  $p < 0.05$  (post hoc Fischer test).

## Statistical significance difference between the FN group and the FN + MWd group at  $p < 0.001$  (post hoc Fischer test).

The right column reports  $p$  value of the statistical results between the MWp and the FN + MWd group (post hoc Fischer test).

of ultra fast MW irradiation over simple nitrogen freezing mainly by avoiding anaerobic metabolism initiation and subsequent post mortem degradation as a result of irreversible enzyme inactivation (Medina et al., 1980). Our results are coherent with those of the recent report by De Graaf et al. (2009) who used *in situ* 3D MRI to investigate the effect of focused beam MW irradiation on post mortem modifications. This group demonstrated that MW irradiated rat brains possess the structural integrity and temporal stability allowing acquisition of high-resolution *in situ* MR spectra and images that reflect the *in vivo* condition. This has previously been suggested by histopathological studies (Login and Dvorak, 1994). Moreover, we found lower concentrations for some neurotransmitters (Asp, GABA and Glu) in the FN compared to the other groups. The cerebral metabolite concentrations assessed in this study by <sup>1</sup>H HRMAS NMR after ultra fast MW irradiation are within the range of a comparable study recently published (Risa et al., 2009). Thus, the fixation properties of pulsed high energy MW might be extremely valuable in sample preparation before HRMAS analysis. The absolute concentrations might be influenced by the

amount of D<sub>2</sub>O added which may affect metabolite extraction from the tissue sample to the water. However, the quantity of D<sub>2</sub>O added to the samples was similar in all study conditions. Nonetheless our data confirm that, by using the technique of enzyme inactivation by pulsed MW irradiation, a far more accurate determination of endogenous cerebral metabolites should be achievable.

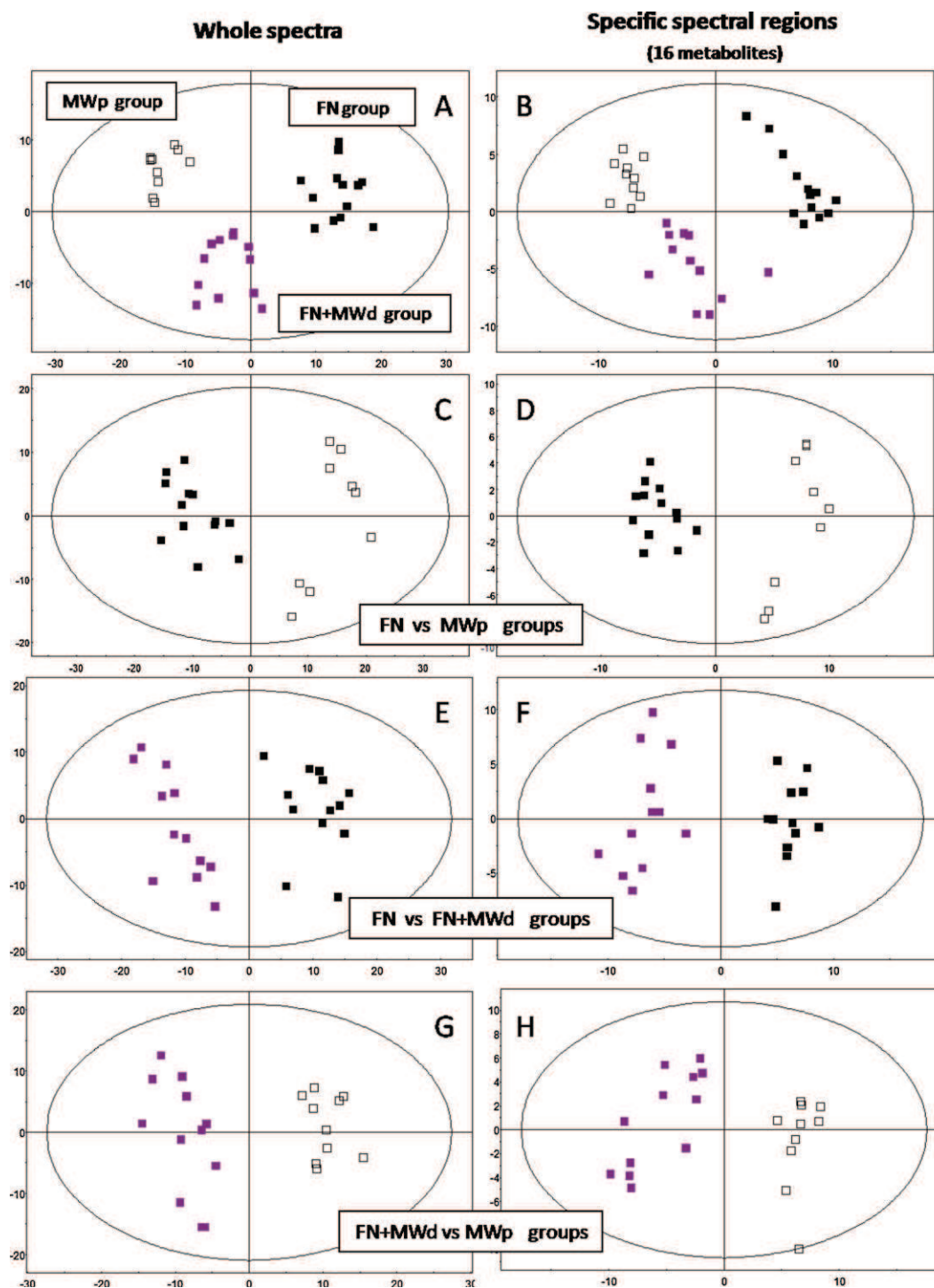
On the other hand, it has been suggested that temperature elevation during a few seconds may induce biomolecules trapping. In the case of HRMAS NMR analysis, metabolites trapped to adjacent proteins may modify the proportion between NMR visible and invisible parts of a given metabolite. This might explain why Cho, Lac, mIns were significantly reduced in the MWp compared to the FN group. However, this does not happen with brain prostanoids which, however, have a higher molecular weight (Golovko and Murphy, 2008). Additional investigations using for example labeled metabolites might be necessary.

Regarding the FN + MWd group, metabolite concentrations can be affected by both freezing and longer-lasting microwave irradiation and hence heating of the sample. They are more widespread

**Table 2**

Summary of significant statistical changes in metabolite concentration over time in cortical biopsy samples from Wistar rats after nitrogen freezing without (FN group), after ultra fast MW irradiation (MWp group) and after domestic MW irradiation (FN + MWd group). Intragroup comparison using non-parametric test for paired sample, see Section 2.

Metabolite	Nitrogen freezing (FN group, n = 3)			Pulsed Microwaves (MWp group, n = 3)			Domestic Microwaves (FN + MWd group, n = 3)		
	10 min vs 1 h	10 min vs 4 h	10 min vs 15 h	10 min vs 1 h	10 min vs 4 h	10 min vs 15 h	10 min vs 1 h	10 min vs 4 h	10 min vs 15 h
Acetate	-	-	<0.05+	-	-	-	-	-	-
Alanine	-	<0.05+	<0.005+	-	-	-	-	-	-
Aspartic Acid	-	-	<0.05+	-	-	-	-	-	-
Choline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatine	-	-	<0.05+	<0.05+	<0.05+	<0.05+	-	<0.05+	<0.05+
GABA	<0.05+	<0.05+	<0.05+	-	-	-	-	-	-
Glutamine	<0.05+	<0.05+	<0.05+	-	-	-	<0.05+	<0.005+	<0.005+
Glutamate	-	-	-	-	-	-	-	<0.05+	<0.005+
Glycine	<0.05+	<0.05+	<0.01+	-	-	-	-	-	-
Lactate	-	-	<0.05+	-	-	-	<0.05+	<0.05+	<0.05+
myo-Inositol	-	<0.05+	<0.05+	-	-	-	-	-	<0.05+
NAA	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.005+
Phosphocholine	-	-	<0.05+	-	-	-	-	-	-
Phosphocreatine	-	-	-	-	<0.05-	<0.05-	-	-	-
Taurine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valine	-	-	<0.05+	-	-	-	-	-	-

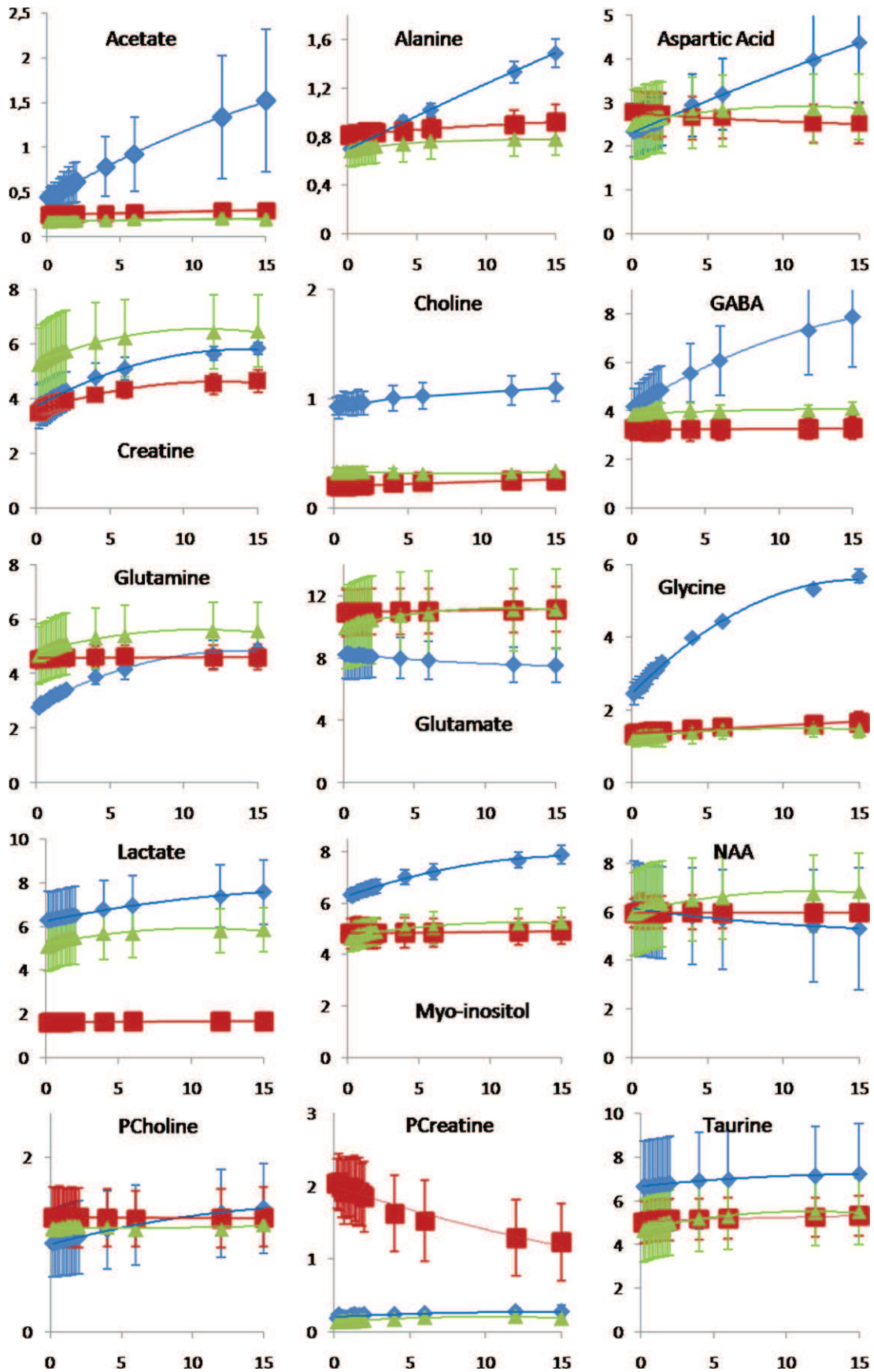


**Fig. 2.** PCA model based on whole  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra (left panel; A, C, E, G) or spectral regions from 16 metabolites (right panel; B, D, F, H) after the first acquisition ( $t = 10$  min) of cortical cerebral samples from Wistar rats after ultra fast *in vivo* MW irradiation (MWp group, open squares), after nitrogen freezing (FN group, black squares) and after nitrogen freezing and domestic MW irradiation (FN + MWd group, purple squares). For each model  $R^2X$  and  $Q^2$  values are reported in Section 3.

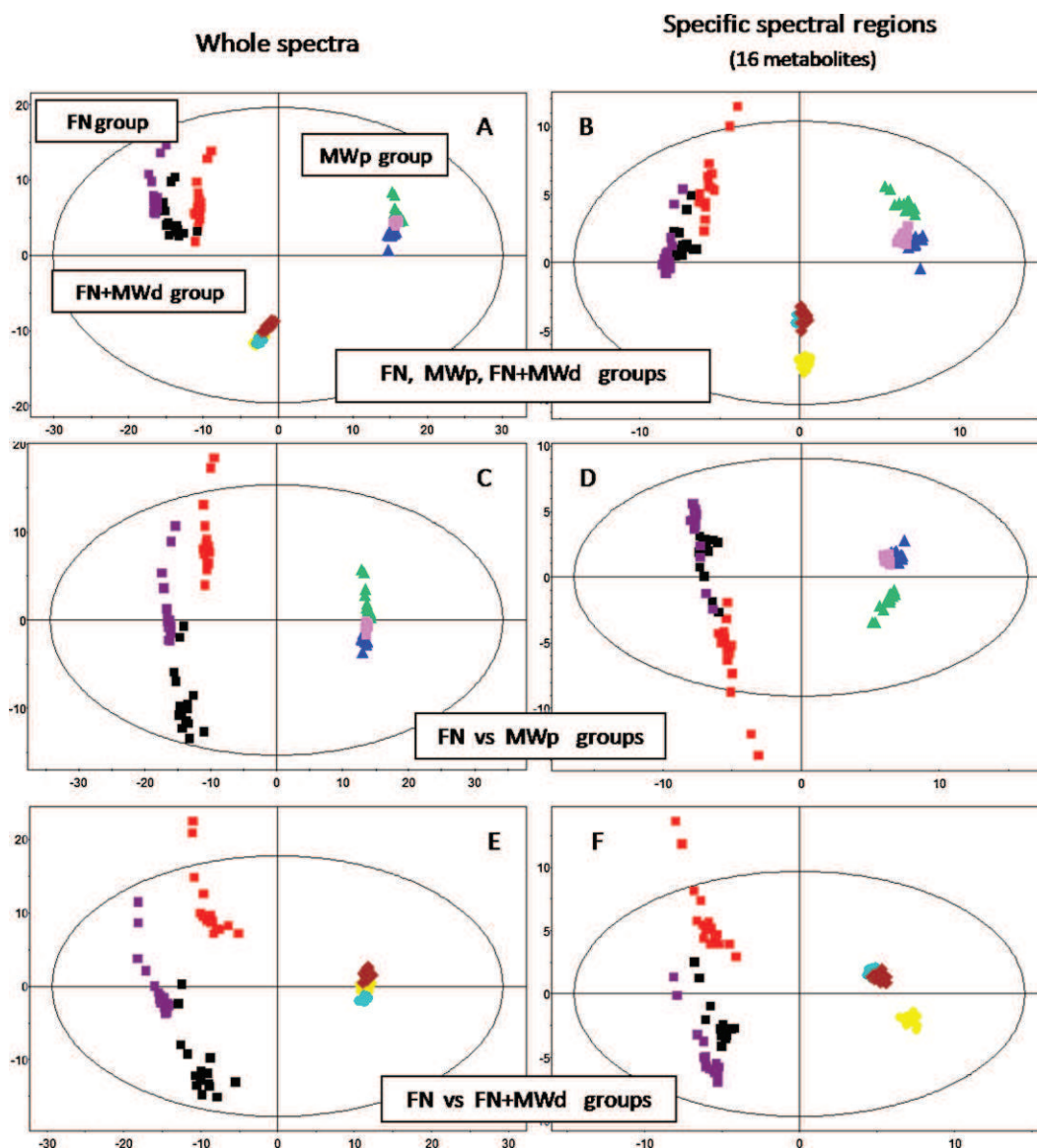
and close to FN or MWp values, depending on the metabolite. To our best knowledge, this is the first HRMAS NMR study using combined nitrogen freezing and domestic microwave technology which needs further investigation.

Another great advantage of MW irradiated brain samples for HRMAS NMR analysis stems from their extreme spectral stability over time under long-lasting continuous spinning conditions. MW irradiated samples exhibited a marked stable metabolomic pattern even after numerous hours of continuous acquisition. Such results

were observed when applying ultra fast and pulsed MW on living rodent (MWp group) but it was also achieved, to a lesser extent though, using domestic MW after nitrogen freezing (FN + MWd group). We showed that only 2 out of the 16 studied metabolites exhibited a significant signal change after a 15 h period of continuous acquisition in the MWp group, whereas this number raised up to 11 in the FN group. The combined use of nitrogen freezing and domestic microwave (FN + MWd) also showed signal stabilization over time and led to intermediate data, with 4 metabolites exhibit-



**Fig. 3.** Comparison of relative metabolite concentration changes over time during continuous HRMAS experiments after ultra fast *in vivo* MW irradiation (MWp group, squares,  $n = 3$ ), after nitrogen freezing (FN group, diamonds,  $n = 3$ ) and after nitrogen freezing and domestic MW irradiation (FN+MWd group, triangles,  $n = 3$ ). Spectra were acquired every 10 min during the first 2 h and at 4, 6, 12 and 15 h. The vertical axis represents metabolite concentration in  $\text{nmol mg}^{-1}$  of tissue. Standard deviation are represented in each group. The horizontal axis represents time (h).



**Fig. 4.** PCA model based on whole  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra (left panel; A, C, E) or on specific spectral regions of 16 metabolites (right panel; B, D, F) from 13 consecutive acquisitions (9 during the first 2 h and then at 4, 6, 12 and 15 h) of cortical cerebral samples from Wistar rats after ultrafast *in vivo* MW irradiation (MWp group), after immediate nitrogen freezing (FN group) and after nitrogen freezing followed by domestic MW irradiation (FN+MWd group). Each color represents the 13 consecutive acquired spectra from one cerebral biopsy (3 times, 13 spectra per group).

ing signal changes after 4 h of continuous spinning. This number rose to 6 after 15 h.

The mechanism by which MW irradiations make biological samples so stable under continuous spinning has not yet been clarified. *In situ* biochemical variations observed during HRMAS acquisition may be due to several factors. One factor might be a progressive degradation of the sample. Since these samples are usually not fixed before HRMAS analysis, several enzymes might have a residual activity during acquisition even at  $4^\circ\text{C}$ . Another factor concerns mechanical stress induced by continuous spinning. Deleterious effects of high spinning rate (5 kHz) on cerebral samples have already been suggested for relatively long periods of acquisition (Opstad et al., 2008). This mechanical stress may lead to biochemical changes and/or spectral variations during the experiment. Such effects might be related to the concept of NMR-visible and -invisible metabolites. Cases of NMR-invisible metabolites have been reported for Cr, Lac (De Graaf et al., 1999) and Glu (Kauppinen and Williams, 1991). This phenomenon is thought to rely, at least partly, on environment, ability to bind to adjacent pro-

teins and magnetic transfer properties of metabolites (De Graaf et al., 1999; Middleton et al., 1998). It is known that pulsed MW irradiation elevates the temperature of the sample (near  $80^\circ\text{C}$ ) during a very short period (less than 2 s) and denaturates proteins in an irreversible manner. In turn, samples lose water and their mechanical properties are modified. As a consequence biological samples may be more “resistant” towards continuous spinning, and less prone to biochemical variations. This might also be true for domestic microwave although irradiation is not focused, provides less power and is 10-fold longer. Nonetheless NMR signal stabilization could also be observed in the FN+MWd group. A typical illustration is the variation of the PCho level. PCho is suggested to be a marker of cellular damage (Opstad et al., 2008). In the present study, PCho concentration remained stable over time in both MW groups even after 15 h while it increased significantly and progressively over time in the FN group. This change could reflect spinning induced mechanical cell damage and/or biochemical variations, as suggested previously (Opstad et al., 2008).

Hence pulsed high energy MW may limit cellular damage induced by spinning that in turn modifies the proportions of visible and invisible metabolites. mIns has been shown to remain stable for over 24 h postmortem in bovine brain homogenates (Michaelis et al., 1996) and rabbit brain (Petroff et al., 1988). Here, the concentration of the latter metabolite only increased in the FN group, most likely as a result of lack of tissue fixation and prolonged spinning. Another example is Gln that was reported to be stable in biopsied human brain tissue when maintained at 35 °C over a 4 h period (Knörle et al., 1997; Perry et al., 1981). In this study, in the first 4 h Gln increased in the FN group and remained stable in the MWp group. NAA decreased in the FN group and was stable in the MWp group. On the other hand, concentration of Gly has been shown to be superior in autoptic brain tissue compared to fresh cerebral biopsies samples (Knörle et al., 1997). Here, Gly concentration increased only over time in the FN group while it remained stable in the MWp and FN+MWd groups. Thus, the increase of Gly in the FN group seems to be rather linked to sample spinning. Hence the use of prior MW fixation might be helpful to disentangle NMR signal variations associated to sample degradation from those associated to visible and invisible metabolites (mainly metabolites closely tied to macromolecules). To this end, the influence of different spinning rates and durations has to be further investigated. Thus, our results are in agreement with the proposal formulated by Opstad et al. (2008) who considered that ischemia seemed to have less effect on metabolite profile than prolonged spinning time. The present data tend to indicate that such deleterious effects might be drastically reduced by prior ultra fast MW fixation.

In conclusion, we showed here that the use of HRMAS <sup>1</sup>H NMR combined to ultra fast *in vivo* MW irradiation of the rodent brain compared to the more widely used instant nitrogen freezing procedure allowed, as expected, a much better preservation of several metabolites essentially linked to post mortem degradation and anaerobic metabolism as well as less labile metabolites such as neurotransmitters. Our report indicates that MW irradiation will undoubtedly increase the reliability of metabolite assignment and quantification by powerful NMR signal stabilization (without adding NMR signals from other chemical fixation methods). Thus the build-up of dedicated MW ovens for *ex vivo* fixation should be considered giving specific attention to energy output, irradiation time, temperature elevation, sample volume, magnetron warm-up (Login et al., 1998). Finally, snap freezing remains a reliable fixation technique for HRMAS NMR analysis, mainly for short acquisition times.

## Acknowledgements

This work is part of the CARMen project and was supported by grants from Région Alsace, Oseo, Communauté Urbaine de Strasbourg, Conseil Général du Bas-Rhin, Bruker BioSpin, Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We thank Estelle Konig for friendly, professional and helpful technical assistance. Dr. J.C. Cassel is acknowledged for the free access to his microwave device and his assistance in its use. We also thank Pr. J.P. Bellocq and the Centre de Ressources Biologiques of the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

## References

Ainley CD, Ironside JW. Microwave technology in diagnostic neuropathology. *J Neurosci Methods* 1994;55:183–90.

Burns MA, Taylor JL, Wu CL, Zepeda AG, Bielecki A, Cory D, Cheng LL. Reduction of spinning sidebands in proton NMR of human prostate tissue with slow high-resolution magic angle spinning. *Magn Reson Med* 2005;54:34–42.

De Graaf RA, Chowdhury GM, Brown PB, Rothman DL, Behar KL. In situ 3D magnetic resonance metabolic imaging of microwave-irradiated rodent brain: a new tool for metabolomics research. *J Neurochem* 2009;109:494–501.

De Graaf RA, Van Kranenburg A, Nicolay K. Off-resonance metabolite magnetization transfer measurements on rat brain *in situ*. *Magn Reson Med* 1999;41:1136–44.

Elbayed K, Dillmann B, Raya J, Piotto M, Engelke F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J Magn Reson* 2005;174:2–26.

Geddes JW, Chang NG, Ackley DC, Soultanian NS, McGillis JP, Yokel RA. Postmortem elevation in extracellular glutamate in the rat hippocampus when brain temperature is maintained at physiological levels: implications for the use of human brain autopsy tissues. *Brain Res* 1999;831:104–12.

Golovko MY, Murphy EJ. An improved LC–MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation head-focused microwave irradiation and liquid–liquid extraction. *J Lipid Res* 2008;49:893–902.

Kauppinen RA, Williams SR. Nondestructive detection of glutamate by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy in cortical brain slices from the guinea pig: evidence for changes in detectability during severe anoxic insults. *J Neurochem* 1991;57:1136–44.

Knörle R, Assmann D, Landwehrmeyer GB, Scheremet R, Müller K, Feuerstein TJ. Aspartate, glutamate, glutamine, glycine and gamma-aminobutyric acid in human biopsied neocortical areas: comparison to autoptic tissue. *Neurosci Lett* 1997;221:169–72.

Login GR, Dvorak AM. Application of microwave fixation techniques in pathology to neuroscience studies: a review. *J Neurosci Methods* 1994;55:173–82.

Login GR, Leonard JB, Dvorak AM. Calibration and standardization of microwave ovens for fixation of brain and peripheral nerve tissue. *Methods* 1998;15:107–17.

Lust WD, Murakami N, De Azeredo F, Passonneau JV. A comparison of methods of brain fixation. In: Passonneau JV, Hawkins RA, Welsch FA, Lust WD, editors. *Cerebral Metabolism and Neural Function*. New York: Williams & Wilkins; 1980. p. 10–9.

Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquier J, Revert A, Ferrer P, Llàcer JL, Piotto M, Assemat O, Celda B. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples *ex vivo* and *in vivo* <sup>1</sup>H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 2004;17(4):191–205.

Medina MA, Deam AP, Stavinocha WB. Inactivation of brain tissue by microwave irradiation. In: Passonneau JV, Hawkins RA, Welsch FA, Lust WD, editors. *Cerebral Metabolism and Neural Function*. New York: Williams & Wilkins; 1980. p. 56–69.

Michaelis T, Helms G, Frahm J. Metabolic alterations in brain autopsies: proton NMR identification of free glycerol. *NMR Biomed* 1996;9:121–4.

Middleton DA, Bradley DP, Connor SC, Mullins PG, Reid DG. The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue. *Magn Reson Med* 1998;40:166–9.

Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning (1)H NMR. *NMR Biomed* 2008;21:1138–47.

Perry TL, Hansen S, Grandham SS. Postmortem change of amino compounds in human and rats brain. *J Neurochem* 1981;36:406–10.

Petroff OA, Ogino T, Alger JR. High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of rabbit brain: regional metabolites levels and postmortem changes. *J Neurochem* 1988;51:163–71.

Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J. Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under Magic Angle Spinning: effects of radial B1 inhomogeneities. *J Magn Reson* 2001;149:114–8.

Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, Imperiale A, Neuville A, Brigand C, Bellocq JP, Elbayed K, Namer IJ. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* 2008;5:292–301.

Pontén U, Ratcheson RA, Salford LG, Siesjö BK. Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J Neurochem* 1973;21:1127–38.

Risa O, Melo TM, Sonnewald U. Quantification of amounts and (<sup>13</sup>C) content of metabolites in brain tissue using high resolution magic angle spinning (<sup>13</sup>C) NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2009;22:266–71.

Sharpless NS, Brown LL. Use of microwave irradiation to prevent postmortem catecholamine metabolism: evidence for tissue disruption artifact in a discrete region of rat brain. *Brain Res* 1978;140:171–6.

Stavinocha WB, Weintraub ST, Modak AT. The use of microwave heating to inactivate cholinesterase in the rat brain prior to analysis for acetylcholine. *J Neurochem* 1973;20:361–70.

Taylor JL, Wu CL, Cory D, Gonzalez RG, Bielecki A, Cheng LL. High-resolution magic angle spinning proton NMR analysis of human prostate tissue with slow spinning rates. *Magn Reson Med* 2003;50(3):627–32.

Veech RL, Harris RL, Veloso D, Veech EH. Freeze-blowing: a new technique for the study of brain *in vivo*. *J Neurochem* 1973;20:183–8.

Violante IR, Anastasovska J, Sanchez-Canon GJ, Rodrigues TB, Righi V, Nieto-Charques L, Parkinson JR, Bloom SR, Bell JD, Cerdan S. Cerebral activation by fasting induces lactate accumulation in the hypothalamus. *Magn Reson Med* 2009;62(2):279–83.

Waters NJ, Garro DS, Farrant RD, Haselden JN, Connor SC, Connely J, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. High resolution magic angle spinning (1)H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition. *Anal Biochem* 2000;282:16–23.

Wu CL, Taylor JL, He W, Zepeda AG, Halpern EF, Bielecki A, Gonzalez RG, Cheng LL. Proton high-resolution magic angle spinning NMR analysis of fresh and previously frozen tissue of human prostate. *Magn Reson Med* 2003;50:1307–11.

## ANNEXE 2

PUBLICATION n°2

Piotto M.; Moussalieh F.M.; Imperiale A.; Benahmed M.A., **Detour J.**; Bellocq J.P.; Namer I.J.; Elbayed K. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by <sup>1</sup>H HRMAS NMR. In Methodologies in metabolomics: experimental strategies and techniques for metabolomics research (Ed. Lutz P.). Cambridge University Press, 2012.

## **23** Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques for Metabolic Profiling of Human Tissues by Proton High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance

*Martial Piotto, François-Marie Moussallieh, Alessio Imperiale, Malika A. Benahmed, Julien Detour, Jean-Pierre Bellocq, Izzie J. Namer, and Karim Elbayed*

High-resolution magic angle spinning (HR-MAS) is a nuclear magnetic resonance (NMR) technique (1–3) that enables the characterization of metabolic phenotypes of intact cells, tissues, and organs under normal and pathological conditions. As with NMR in general, HR-MAS can be applied to a variety of NMR-active nuclei. However, this chapter is exclusively concerned with the proton-based ( $^1\text{H}$ ) variant, which is the most commonly used HR-MAS method. Therefore, in the remainder of this chapter, “NMR” and “HR-MAS” are synonymous with “ $^1\text{H}$  NMR” and “ $^1\text{H}$  HR-MAS.” A brief introduction of NMR basics and an example of  $^{31}\text{P}$  HR-MAS NMR spectroscopy are presented in Chapter 22. HR-MAS can be used to assess cellular metabolic networks that are directly related to specific genetic information and to the regulation of specific gene transcripts. The basic principle of HR-MAS is to spin samples at a 54.7-degree angle (“magic angle”) with respect to the main magnetic field,  $B_0$ , to remove most of the line broadening created by magnetic susceptibility gradients in heterogeneous systems such as biopsy specimens (3–8). Magic-angle spinning results in a dramatic sharpening of the NMR signals of the metabolites contained in a biopsy sample. The first applications of HR-MAS to biological tissues were published in 1996 by Cheng et al. (9). In this seminal publication, data obtained on malignant lymph nodes and on tissue samples from different brain regions in a case of Pick’s disease were presented. Since then, the technique has been applied to study various pathologies in brain (10–15), breast (16–21), prostate (22–25), kidney (26–28), cervix (29,30), esophagus (31), and colon (32–34). Several reviews describing HR-MAS studies of different human malignancies have appeared in the literature more recently (35–37). However, most of the studies reported until now have been performed on a small number of biopsy samples and only in academic research laboratories as opposed to a hospital environment. Certain procedures used in these studies can differ substantially from laboratory to laboratory, making it difficult to compare results. There is a need for establishing a well-defined protocol covering all aspects of a large-scale metabolic study of biopsy samples. The same fundamental

## 1. Sample Collection and Storage

497

problem had to be solved previously for metabolic studies of urine, plasma, serum, and tissue extracts, and standard protocols eventually were adopted for some of these analyses (38,39) (biofluid NMR methods are described in Chapters 11 through 17). Regarding the study of human biopsy specimens, the situation has been more confusing than for biofluids because only one article by Beckonert et al. (40), has detailed a protocol for the study of biopsy samples by HR-MAS. This article is extremely valuable and describes the essential steps that have to be followed for a successful study. However, the authors' protocol was not embedded in the context of a medical environment where tissue samples have to be analyzed within the regular flow of routine analysis taking place daily in a hospital. Notwithstanding, the HR-MAS NMR spectroscopic protocols employed by groups working on human samples have begun to converge in recent years, and the rough contours of a consensus are emerging.

This chapter is a first attempt to standardize formally the protocols being used in this field and is part of the CARMEN (*Cancer Résonance Magnétique Nucléaire*) project carried out at the Strasbourg University Hospitals. This chapter describes the current stage of the development of a general protocol for HR-MAS NMR spectroscopy of human biopsy specimens, optimized for use in a hospital environment. This work is based on the results of more than 5 years of practical progress toward establishing a common, clinically relevant approach. The techniques described in the sections of this chapter are widely used today in laboratories analyzing human biopsy samples by HR-MAS NMR spectroscopy, but alternative approaches are also pointed out. The different steps involved in these experimental protocols are explained in detail, and the underlying rationales are presented, followed by some practical application examples in Sections 7 and 8. Reliable metabolic profiling of human biopsy samples can be achieved only if numerous conditions are met in the protocol used for analysis. To illustrate the subject of this study, we present in Figure 23.1 a representative HR-MAS one-dimensional (1D) CPMG (41).  $^1\text{H}$  NMR spectrum obtained from an oligodendroglioma biopsy sample, which is a grade II/III brain tumor (42). Many metabolites are easily identified in this spectrum, such as creatine (Cr) and choline (Cho). Characteristic brain metabolites such as *N*-acetyl aspartate (NAA) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) are also visible.

### 1. Sample Collection and Storage

Proper sample collection is one of the most critical aspects of successful HR-MAS analysis of human biopsy specimens. In contrast to metabolic studies performed on body fluids – notably urine, plasma, serum, and semen – where sample collection is relatively straightforward, taking a tissue sample from a patient is an invasive process. HR-MAS studies of human tissue, in contrast to studies performed on animal models, need to be carefully integrated into a standard medical procedure. Typically, tissue samples are collected by a surgeon during an operation either as a small biopsy specimen or as a large part of an organ during an exeresis (ablation of the organ). In the first case, the amount of tissue sample is small (a few milligrams), whereas in the second case, entire organs can be removed. In a medical setup, these tissue samples are used primarily for histopathological analysis and for biomolecular analysis. Histopathological analysis consists of studying the detailed



498 Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques

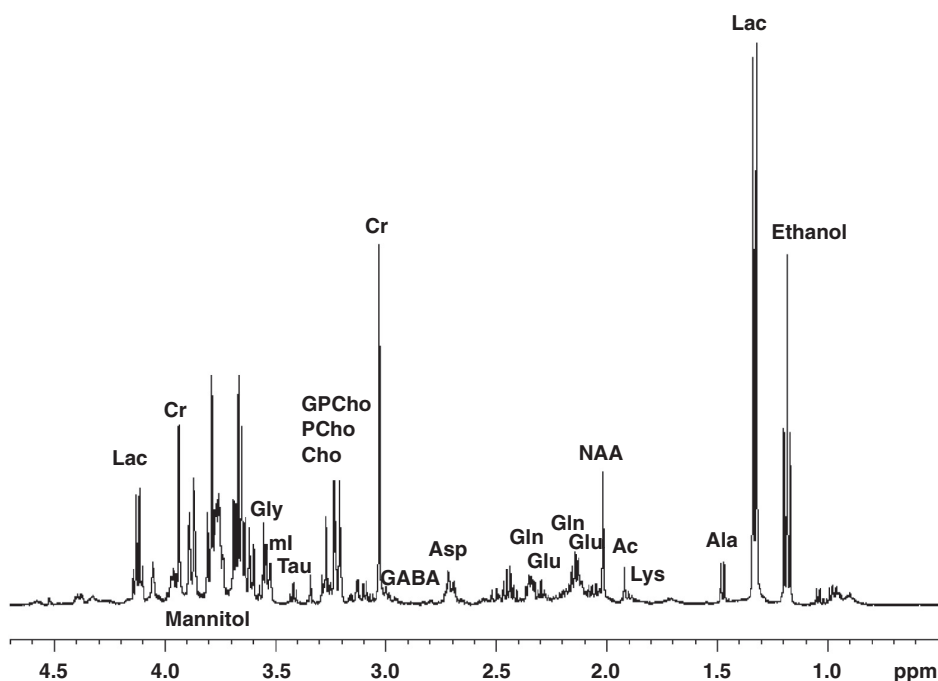


Figure 23.1. 1D  $^1\text{H}$  HR-MAS CPMG spectrum of a human oligodendroglioma biopsy sample at 500 MHz. Characteristic metabolites are annotated. Experimental conditions: temperature 277 K, spinning speed 3.5 kHz, weight of biopsy specimen 15 mg, experiment time 10 minutes. All spectra presented in this chapter were acquired on an 11.7 T AVANCE III system (spectrometer hardware and software from Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

morphological features of a tissue under a microscope using appropriate staining agents and is currently the gold standard used to evaluate tissue characteristics, providing information pertaining to the nature of the tissue (e.g., the grade of a tumor). Histopathological diagnosis plays a fundamental role in defining a patient's prognosis and treatment and management. After surgical resection, the tissue specimens are immediately sent to the histopathology department for sampling and diagnostic purposes. At this point, a histopathologist selects the samples that are needed for histopathological diagnosis, routine biomolecular analysis, and immunochemical (IHC) and *in situ* hybridization (ISH) analysis with a morphological background. Samples selected for metabolic studies and future biomolecular analysis are snap-frozen and stored in a  $-80^\circ\text{C}$  deep freezer located in the biobank of the hospital. All relevant data regarding the sample and the patient are also carefully documented for future use. At the present time, the most practical way of conducting an HR-MAS analysis of human tissue samples is to use samples available from the biobank of a hospital. In cases where the delay between sample collection and sample freezing needs to be kept very short (smaller than 5 minutes) to obtain relevant metabolic information (i.e., brain tissues), snap-freezing may be performed immediately in the operating room. For animal studies, working with tissue samples is less problematic because animals can be sacrificed and samples can be collected immediately. These considerations demonstrate that quality and reproducibility of human biopsy

## 1. Sample Collection and Storage

499

samples depend significantly on the surgeon and on the nature of the surgical operation. One of the main parameters to control is the duration of ischemia (i.e., the amount of time during which tissue is left without blood perfusion). This time is critical because both the nature and the quantity of the metabolites detected by HR-MAS are strongly affected by the duration of ischemia. One effect of ischemia is that the amount of lactate increases significantly as a result of anaerobic glycolysis induced by hypoxia. Most tissue samples analyzed by HR-MAS show a large lactate peak. The duration of ischemia is also important for tissues used in certain histopathological analyses. However, ischemia has less influence on cellular structures than it has on metabolic profiles. To determine the total duration of tissue ischemia, two different phases of the surgical operation process need to be examined. The first phase is the removal of the tissue. To prevent excessive bleeding of the patient, the surgeon first clamps the veins and the arteries surrounding the tissue to be excised. This is a required step for many organs (e.g., colon, lung, ovary, kidney) but not for the brain. The associated duration of ischemia depends on the surgeon, the organ operated, and the complexity of the operation. The second phase during which ischemia occurs is after tissue removal. In routine surgery, removed tissue is often left standing in a recipient on the operating table at room temperature before storage in nitrogen. Although the duration of the first phase is strictly defined by the surgical process, the second ischemic delay can be reduced dramatically without adverse effects on the patient's health. While the sample is exposed to room temperature, enzymatic and chemical reactions are active and lead to biochemical degradation processes. Sample degradation is more rapid in some organs than in others. In particular, some metabolites of brain tissue are known to degrade at a faster rate than in many other tissues. For example, *N*-acetyl aspartate (NAA) is rapidly transformed to acetate and aspartate at room temperature (43,44).

An example of a degradation study of a healthy lung biopsy specimen at 24°C is shown in Figure 23.2. The purpose of this experiment was to simulate the combined effects of 1) the second ischemic delay, and 2) the duration of sample rotation during HR-MAS on the metabolic profile of the lung. The first spectrum was recorded at 4°C with a fresh sample at  $t = 0$ . Between each successive experiment, the sample was taken out of the magnet and left standing at room temperature. These spectra show that the metabolic profile of the biopsy sample changed over time. In particular, the signal intensities for glucose (4.65 ppm), phosphorylcholine (3.22 ppm), choline (3.20 ppm), acetate (1.90 ppm), and alanine (1.48 ppm) increased significantly, whereas ascorbic acid (4.53 ppm) decreased. The fact that the apparent concentrations of most metabolites increase with natural sample degradation and with repeated cycles of sample spinning has been noted by several authors (45). This effect is most likely due to progressive degradation of tissue structure. In intact tissue, macromolecules such as enzymes and other relatively immobile and semisolid structures bind a certain amount of small molecules, notably polar metabolites. Because these molecules are much less mobile in a bound state than they are in solution (tissue water), they generate only very broad NMR signals that are virtually undetectable by common NMR methods, as are the macromolecule signals themselves. These signals at most may deform the spectrum baseline but do not permit detailed analysis. As tissue structure decomposes, these macromolecules and other

500 *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

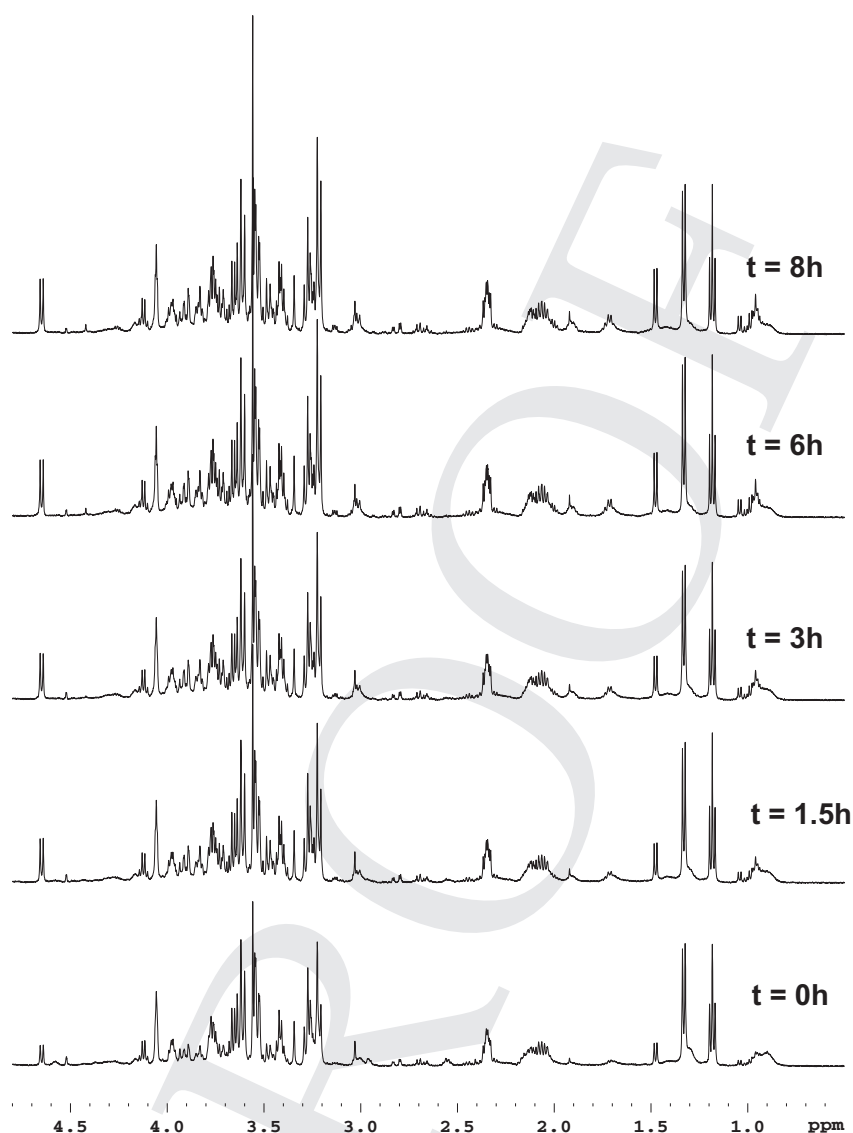


Figure 23.2. Degradation study of a control lung biopsy specimen performed at 24°C to simulate the second time of ischemia. Spectra were recorded at time 0, 1.5, 3, 6, and 8 hours. Between each experiment, the sample was taken out of the NMR instrument and kept at room temperature.

structures with reduced molecular mobility release bound metabolites into intracellular and extracellular water. Once dissolved, these metabolites are highly mobile and become NMR-visible, increasing the intensities of the metabolite peaks in question. Consequently, the further tissue degradation progresses, the more metabolite signals increase until no more molecules are released into solution.

To guarantee tissue sample integrity as much as possible and to reduce the duration of ischemia to a minimum, we have established the following protocol (Figure 23.3). For each type of surgery, a reference person present during the

### 1. Sample Collection and Storage

501

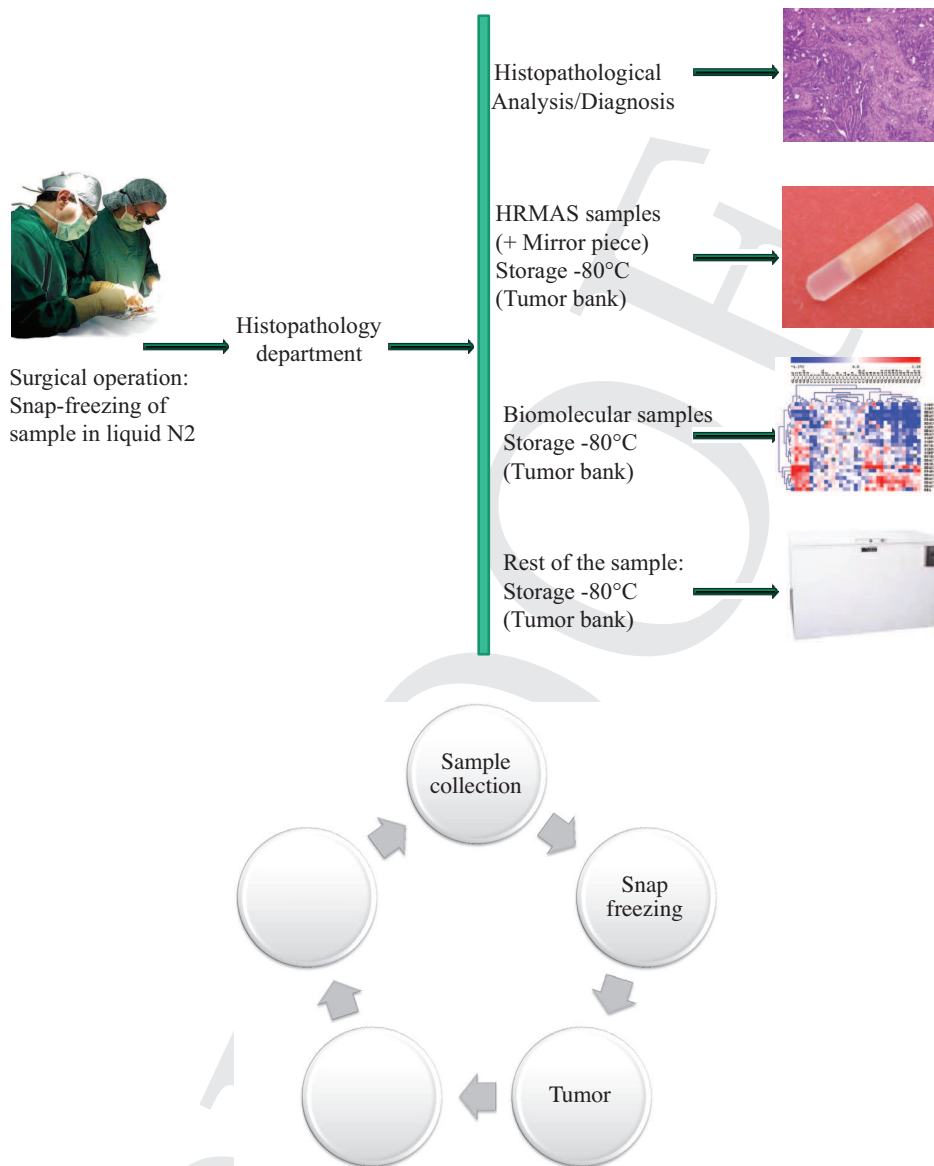


Figure 23.3. Optimized procedure for the collection of human tissues in a hospital.

surgical operation collects the surgical specimen and transfers it rapidly to the histopathology department where a pathologist subdivides it to generate individual specimens for

- 1) routine histopathological analysis which may be complemented with additional analyses, e.g., biomolecular analysis and/or ISH performed on tissues fixed with formol and embedded in paraffin;
- 2) biomolecular analysis based on frozen samples;
- 3) HR-MAS analysis;
- 4) research purposes.

## 502    *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

For the HR-MAS study, two individual specimens are collected: one for the metabolic analysis itself and the other (the mirror sample) for a matched histological analysis. After this selection, the two samples for the HR-MAS study and the research samples are stored in a  $-80^{\circ}\text{C}$  deep freezer. With this procedure, the tissue sample is continuously kept at low temperature after excision in the operating room. This procedure guarantees a high degree of sample integrity, which is essential not only for HR-MAS metabolic analysis but also for biomolecular analysis. At  $-80^{\circ}\text{C}$ , samples can be stored for several years with minimum alteration (46). A variant of the above-described procedure consists of selecting the final, individual specimens directly in the operating room, snap-freezing them in liquid nitrogen, and keeping them at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Because it is known that repeated cycles of sample freezing and thawing alter the structure of tissues (47–49), it is recommended to minimize the number of cycles (typically one or two) before HR-MAS analysis. The most common sources of contamination giving rise to signals detectable by NMR in tissue samples are 1) ethanol (peaks at 1.18 ppm and 3.65 ppm), which is used for sterilization of surgical instruments, and 2) optimum cutting temperature (OCT) cryoprotective embedding medium that contains soluble glycols and resins. OCT medium might be detectable in samples that were previously used, at least in part, for a histopathological study. The OCT signal is easily identified in 1D  $^1\text{H}$  spectra because it gives rise to a large singlet at 3.70 ppm. Samples containing a large amount of either of these two compounds should be discarded from the analysis. When present in small quantities, their signals can be simply removed from the spectrum by digital processing.

The tissue sample collection procedures presented here describe the process as performed at the Strasbourg University Hospitals; as of this date, corresponding procedures from other clinical environments have not been described in the published literature. However, sample storage is very similar across laboratories active in this field (40,50).

### **2. Sample Preparation**

To eliminate the risk of sample cross-contamination and cleaning issues, biopsy samples are now routinely prepared in disposable inserts. These inserts are made of polychlorotrifluoroethylene (PCTFE), marketed as Kelf (Daikin Industries, Osaka, Japan), and have an active volume of about 30  $\mu\text{L}$ . This volume is sufficient to accommodate 15 to 20 mg of tissue and 10  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$ . There is no need to use a buffer for biopsy studies because the physiological salts naturally present in biological tissues already provide sufficient buffering capacity. To prevent as much as possible sample degradation during the preparation procedure, samples should be prepared in the frozen state inside a cryostat regulated at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figure 23.4). This type of equipment is routinely used in histopathology departments for the preparation of histological sections. The amount of specimen used for each sample ( $\sim 15$  mg) and the time required for preparation should be kept as constant as possible for all samples involved in a particular study, which is greatly facilitated by the use of biopsy punches. Because it is important to know the exact amount of tissue used in each analysis, the insert should be weighed before and after filling. Once the specimen is introduced and weighed,  $\text{D}_2\text{O}$  is added for the purpose of locking the

## 2. Sample Preparation

503

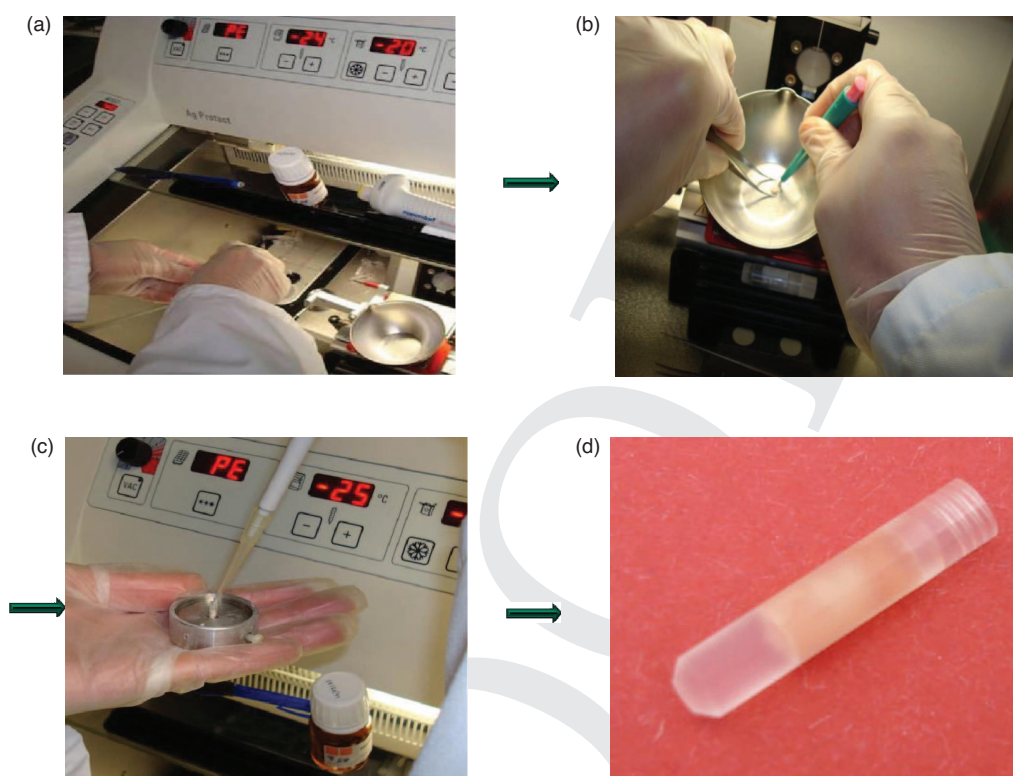


Figure 23.4. Biopsy sample preparation for HR-MAS studies: (a) Cryostat at  $-20^{\circ}\text{C}$ . (b) Biopsy punch used to take the biopsy specimen. (c) Introduction of the biopsy specimen and  $\text{D}_2\text{O}$  into the insert. (d) Final insert closed with a transparent conical plug.

spectrometer during the NMR experiment. After the insert has been closed with a plug, it is stored back in the  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer. At the time of analysis, the insert is placed in a standard 4-mm  $\text{ZrO}_2$  rotor of the type classically used for solid-state NMR studies (3). To obtain reproducible sample preparation, this task should be entrusted to a meticulous person who performs this preparation on a routine basis. The entire sample preparation process takes only 2 to 3 minutes for a trained person, minimizing sample degradation. At a later stage of development, automatic sample preparation procedures should be considered. Advantages of a disposable insert are that the tissue sample can be stored back in the  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer after HR-MAS analysis without the need for removing it from its recipient and that the rotor itself can be immediately reused for subsequent analyses. The biopsy specimen is available for histopathological analysis if needed. This is an important point because HR-MAS and histopathological analysis both can be performed on the same sample in cases where it is uncertain whether the mirror sample represents the same type of tissue that has been used for obtaining the metabolic data. At the present stage of development, histology on the very samples that have been used in HR-MAS experiments is not performed on a routine basis because cutting the insert to generate 5- $\mu\text{m}$  slices suitable for histopathological analysis takes an extra amount of time. For this reason, the use of mirror samples cannot entirely be replaced by post-HR-MAS histology at this time.

## 504    *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

In addition to our laboratory, these sample preparation techniques have been implemented by numerous groups working in this field (40,50). However, slight variations can be found. Some authors, instead of adding pure D<sub>2</sub>O to the biopsy sample, prefer a solution of phosphate-buffered saline (PBS) in D<sub>2</sub>O (16). The advantage of this approach is twofold: 1) The liquid being in direct contact with tissue material is isoosmotic; this may be beneficial to tissue integrity by minimizing osmotic pressure. In this way, metabolite leakage from the tissue may be prevented or at least reduced. 2) The buffering capacity of the liquid surrounding the tissue is increased, facilitating the maintenance of constant, tissue-like pH. However, the overall salt content of the sample is increased with PBS/D<sub>2</sub>O versus D<sub>2</sub>O alone. This may result in a reduction of the sensitivity of the NMR experiment.

### **3. Data Acquisition**

Before running an HR-MAS analysis of biopsy samples, one should ensure that the spectrometer is operational and meets certain specifications. First, the temperature existing inside the rotor should be calibrated precisely for the spinning speed to be used subsequently for tissue HR-MAS because samples are being heated owing to rotation (51). A calibration sample consisting of 100% MeOH or 99.8% MeOD/0.2% MeOH (52) allows high-precision temperature calibration. Because sample degradation is always of prime concern, low temperatures are mandatory, and a value of 4°C is typically chosen. This temperature ensures that tissue samples are not frozen during HR-MAS analysis.

The spinning speed is usually chosen to be as low as possible to prevent sample degradation secondary to the centrifugal forces induced by rotation. At 500-MHz measurement frequency (11.7T magnetic field), a spinning speed of 3,500 Hz (corresponding to 7 ppm) is adequate. This value is sufficiently high to prevent spinning side bands associated with the rotation to fall in the crucial 4.7- to 0.5-ppm region. For different magnetic fields or when using a wider chemical shift range for metabolite analysis, the spinning speed should be adjusted as needed. Although higher spinning speeds can be technically achieved, it is advisable to limit these to the minimum required because the risk of tissue alteration significantly increases with spinning speed. This effect not only may adversely influence the reproducibility of HR-MAS spectra, but also has detrimental consequences for tissue histology on samples that have undergone HR-MAS spectroscopy.

To obtain spectra with the required quality, the magic-angle setting (54.7 degrees) should be set precisely because it has a direct influence on the line shape of the samples (51). The standard procedure is to use a KBr sample and acquire <sup>79</sup>Br spectra. The intensity of the spinning side bands in the <sup>79</sup>Br spectrum is maximized by adjusting interactively the position of the stator. Once the magic angle is set, the quality of the shims should be checked by using a test sample containing 1% CHCl<sub>3</sub> in acetone-D<sub>6</sub>. It is important to position the probe in the magnet in such a manner that the stator containing the radiofrequency coil is aligned either along the *X* or the *Y* axis of the shim system of the spectrometer. This procedure allows one to decrease the number of active shims and facilitates the shimming procedure. More information concerning the exact spinning angle adjustment procedure can be found elsewhere (51). Typical full width at half height (FWHH) values on the

### 3. Data Acquisition

505

Table 23.1. *Standard acquisition and processing parameters for a one-dimensional CPMG experiment used at a field strength of 500 MHz for a standard biopsy sample of 15 mg (pulse program, cpmgpr1d, and acquisition mode, baseopt)*

<b>1-D CPMG</b>	
<b>Acquisition Parameters</b>	
Temperature	4° C
Rotation speed	3,500 Hz
Relaxation delay	2 sec
Acquisition time	2.34 sec
90° pulse width	About 8 μsec
Receiver gain	128
Sweep width	14 ppm
Number of scans	128
Dummy scans	4
Number of points (real + imaginary)	32k
Length of CPMG	93 msec
Interpulse CPMG delay	286 μsec
Field strength used for water presaturation	50 Hz
Experiment time	10 min
<b>Processing Parameters</b>	
Number of points (complex)	64k
Exponential broadening	0.3 Hz
Baseline correction	Linear

*Note.* The parameters used for the acquisition of a simple “90° pulse-acquire” experiment (pulse program, *zgpr*) are identical except for the absence of CPMG-specific parameters (names of pulse programs and acquisition modes are given in italics as used in Bruker instruments; similar software is available for spectrometers from other manufacturers).

CHCl<sub>3</sub> line at 7.24 ppm should be less than 1 Hz. Once acceptable values have been obtained on the CHCl<sub>3</sub> test sample, biopsy specimens can be analyzed. If the probe is positioned along the Y axis of the shim system, only a small set of shims (Z, Y, YZ, X2–Y2) (51) has to be adjusted for each individual biopsy sample, by optimizing the FWHH of either the lactate resonance at 1.33 ppm or the alanine resonance at 1.48 ppm. The FWHH of each doublet peak should be inferior to about 1.5 Hz. At the present time, gradient-based methods (53–55) are not yet available for automatic shimming of samples spinning at the magic angle; however these methods are under development and should become available in the near future.

For metabolic analysis of tissue samples, 1D <sup>1</sup>H NMR data are typically recorded using either a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) (41) sequence or an experiment employing a simple 90-degree pulse, both with water presaturation. A solvent signal suppression sequence frequently used in the field of biofluid metabolomics is 1D <sup>1</sup>H NOESY with presaturation, which also efficiently minimizes broad signals of exchangeable protons (typically urea contained in urine). However, the advantage of <sup>1</sup>H 1D CPMG over 1D <sup>1</sup>H NOESY is that the CPMG sequence reduces the broad signals originating from proteins and lipids contained in biopsy specimens. Without attenuation, lipid signals might easily dominate the tissue spectrum, obscuring metabolite signals of interest. Acquisition parameters of a typical <sup>1</sup>H 1D CPMG biopsy tissue experiment are presented in Table 23.1. The interpulse



506    *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

delay between the 180-degree pulses of the CPMG pulse train is synchronized with sample rotation ( $\omega_r$ ), and is set to 286  $\mu\text{sec}$  ( $1/\omega_r = 1/3,500 = 286 \mu\text{sec}$ ) to eliminate signal losses owing to  $B_1$  field inhomogeneity (56,57). The number of loops (i.e., 180-degree pulses) is typically set to 328, yielding a total CPMG pulse train length of 93 msec. This value is adequate to reduce the intensity of lipid signals to the level of the metabolites in most organs (i.e., brain, colon, kidney, and ovary). For samples originating from organs containing large amounts of lipids, such as breast, the length of the CPMG pulse train should be increased to 200 to 250 msec (58). Metabolite signal intensities are reduced owing to the presence of the CPMG sequence preceding data acquisition, and this attenuation depends on the length of the CPMG pulse train (i.e., effective echo delay [TE]). However, the signal attenuation secondary to a given echo delay decreases with increasing transverse relaxation time ( $T_2$ ) of the observed protons, where  $T_2 = 1/(LW*\pi)$ , with LW being the intrinsic linewidth of the corresponding peak.

With our current protocol, the lines generated by virtually all metabolite molecules are relatively narrow (1 to 1.5 Hz), which indicates that the lower limit for  $T_2$  is approximately 210 msec. The “true”  $T_2$  values should be significantly higher because factors such as residual magnetic field inhomogeneity effects also contribute to the measured linewidth, FWHH. Therefore, no dramatic signal attenuation is to be expected for the metabolites in question when a relatively short CPMG pulse train is employed (e.g., the pulse train length of 93 msec mentioned previously). Because all metabolite resonances exhibit roughly similar linewidths, the signal attenuation secondary to the CPMG pulse train is similar for all metabolites (provided that the actually observed linewidths are not strongly influenced by residual magnetic field inhomogeneities). It is also implied that the relative metabolite concentrations would not be substantially affected by the length of the CPMG pulse train (i.e., pulse train effects would be within the narrow limits indicated by linewidth variations). The same argument holds for the determination of absolute concentrations provided that the spectrum of the metabolite in the reference solution is recorded under the same CPMG conditions that are applied to the tissue samples.

The data acquisition time for each FID is set to 2.34 seconds to provide adequate resolution, and the recycling delay is set to 2 seconds to obtain pseudoquantitative spectra within an acceptable measurement time. Significantly longer recycling delays would be needed to avoid any signal saturation secondary to incomplete longitudinal relaxation of the protons of many metabolites ( $TR \geq 5*T_1$ , where  $T_1$  is the longitudinal relaxation time of the protons in question, and TR is the repetition time for each scan – the sum of the data acquisition time and the recycling delay). However, such delays would result in prohibitively long spectrum acquisition times. Saturation effects must be considered for exact determinations of absolute metabolite quantities based on this protocol.

Typically, 128 scans are acquired, resulting in a total measurement time of 10 minutes. These conditions provide an adequate signal-to-noise ratio and fast turnover and minimize tissue degradation effects; the latter become particularly significant when the overall sample spinning time exceeds 30 minutes. To automate the acquisition process as much as possible and to avoid unnecessary adjustments, the receiver gain of the spectrometer is kept at a constant value (Table 23.1). The only

#### 4. Data Processing

507

parameter individually adjusted for each sample is the 90-degree pulse width. This parameter varies slightly among samples and can affect absolute quantification of metabolites. Further details concerning quantification are mentioned in Section 5 on data analysis and signal assignment.

In essence, the data acquisition protocol is common to virtually all laboratories analyzing human biopsy samples (40,50). Nonetheless, minor variations in experimental parameters have been reported. For example, although it is now accepted that low temperatures should be used for the acquisition of biopsy sample spectra, temperature values ranging from 1°C to 4°C have been published. The length of the CPMG pulse train varies between 50 msec and 250 msec, depending on the project described. This variation can be explained by the fact that this parameter is organ-dependent, and its optimal value depends on the amount of lipid present in the tissue. The exact values used for TR, the data acquisition time, and the interpulse delay of the CPMG pulse train also may differ slightly from the values presented in the protocol described.

#### 4. Data Processing

All 1D <sup>1</sup>H CPMG spectra should be recorded in such a manner that only zero-phase order correction is necessary to phase the spectrum properly (Table 23.1). The first-order phase correction is close to zero for all spectra. This procedure generates spectra with fairly flat baselines and offsets close to zero. The FID is multiplied by an exponential weighting function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz before Fourier transformation (Table 23.1). At the present time, spectra are processed using an automatic baseline correction routine employing a simple linear correction to obtain a baseline level that is exactly at 0. <sup>1</sup>H spectra are referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm. TSP is an unreliable reference for chemical shift referencing because it can bind to various proteins or membranes in the sample, making its chemical shift sample dependent. In the event of the presence of contaminants such as OCT or ethanol at low concentrations, digital processing of the spectra can be used to set the intensity of the corresponding spectral regions to zero.

Although most laboratories use data processing methods very similar to those presented in this chapter (40,50), the reference compound, lactate, is replaced in some protocols with a different metabolite, such as alanine (1.48 ppm) or glucose (5.23 ppm) (59).

#### 5. Data Analysis and Signal Assignment

Specific experiments used for the assignment of metabolites present in biopsy samples are primarily <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC, and DIPSI2 sequences. Measurement times for each these experiments are typically 8 and 15 hours, respectively. Because the duration of these experiments is long, they are acquired on only a few samples that are representative of each class of tissues and exclusively for the purpose of signal assignment. Significant tissue degradation occurs during this long measurement time; therefore, <sup>1</sup>H CPMG experiments have to be completed before these signal assignment experiments. Further assignment methods are described in Chapter 24.

508    *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

In addition, assignment of spectral resonances can be facilitated by using published literature values or specific databases (e.g., Human Metabolome Database (60) or Bruker Metabolic Database). For most biopsy samples, 35 to 45 metabolites are detected. Greater than 90% of the metabolites detected by <sup>1</sup>H HR-MAS NMR are common to all organs. Specific metabolites are more abundant in the brain (NAA, GABA), the adrenal gland (epinephrine) (28), or the prostate (citrate) (22). Quantification of metabolites in each sample is of paramount importance because metabolic profiling potentially reveals characteristic values for sets of metabolites for many healthy and cancerous tissues. With current technology, it is possible to detect by HR-MAS NMR approximately 35 to 45 metabolites in about 15 mg of tissue within an experimental time of about 10 minutes. This corresponds to a detection threshold of about 0.1 mmol metabolite per kg tissue. Because magnetic resonance is an intrinsically quantitative technique, it is possible to obtain exact absolute metabolite levels for each sample, provided that signal saturation effects are taken into consideration or are avoided altogether. The influence of acquisition parameters on signal intensities is discussed in Section 3 on data acquisition. The quantitation technique suggested in this protocol includes calibration by separately measuring the signal intensity of a reference solution containing a known amount of a metabolite, typically lactate, under exactly the same conditions used for the measurement of biopsy samples. We have found that the T1 values measured in these reference solutions were similar to the corresponding values in tissue samples (data not published). In cases where precise absolute quantitation is needed, correction for saturation has to be included as mentioned in Section 3. The fact that CPMG linewidths are also similar in reference solutions and in tissue indicates that any signal attenuation owing to the CPMG pulse train (effective TE) should be similar in both sample types. The recommended quantitation method with the aid of reference solutions provides a good approximation at this stage of development. In addition, a technique using an electronic reference signal for quantitation (Eretic [“electronic reference to access in vivo concentrations”] (61)) associated with a method based on pulse length measurements (PULCON [“pulse length based concentration”] (62)) is particularly powerful (63). The current state-of-the-art Eretic method is a digital version that does not require any additional hardware but only a dedicated program that digitally adds a synthetic reference signal to the NMR spectrum.

At the present time, only peaks that are well resolved in 1D CPMG spectra can be routinely quantified. However, using more sophisticated methods such as LCModel (LCModel Inc., Oakville, Canada) (64) or jMRUI (University of Lyon, Lyon, France) (65), it will eventually be possible to quantify larger sets of metabolites. These advanced techniques have the added advantage of taking into account the entire spectra of all metabolites in the quantitation process, which significantly reduces the probability of overestimating certain metabolite levels owing to “invisible” peaks that may lie under the resonances to be quantitated. This is a common problem in all biological 1D proton spectra. In addition, this software allows one to include model spectra of macromolecules and lipids. These compounds generate very broad resonances that effectively “deform” the baseline, even though CPMG protocols reduce their appearance. Current routine baseline correction methods neglect these effects, which may result in further overestimation of certain metabolite levels. Methods such as LCModel or jMRUI will be recommended for use in

## 6. Statistical Analysis

509

clinical routine protocols once they are able to process large quantities of spectra rapidly and automatically. By and large, the data analysis and signal assignment techniques described in this chapter have found numerous applications in the field of biopsy sample HR-MAS NMR spectroscopy (40,50).

### 6. Statistical Analysis

In most cases, the spectral region between 4.7 ppm and 0.5 ppm of each 1D  $^1\text{H}$  CPMG NMR spectrum is automatically subdivided into regions of 0.01 or 0.001 ppm width for automated statistical evaluation. This process is also known as “binning” or “bucketing.” If necessary, the region between 10 ppm and 5.2 ppm can also be used for the analysis. However, the region containing the residual water signal at approximately 5 ppm is systematically excluded. A large variety of manufacturers provide software platforms that can be used for binning; these platforms can be programmed by users or are programmed by the manufacturer to perform this task. Examples shown in this chapter are based on AMIX software (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

The widths of the bucketing regions can be adjusted to minimize effects of peak shifts owing to variations in pH or salt content. The choice between 0.01 ppm or 0.001 ppm bucketing depends on how well corresponding peaks in the spectra to be compared are aligned. The quality of peak alignment can be assessed easily by inspecting the stacked plots of the spectra to be included in a specific statistical evaluation. The peak integral within each individual bucket region is computed with the aid of AMIX or with a MatLab-based program and normalized with respect to the total integral of the entire spectral region included (typically 4.7 to 0.5 ppm). This procedure allows normalizing all metabolite signals of a given spectrum to tissue sample weight. If necessary, signals originating from contaminants or lipids can also be removed at this stage by excluding the corresponding spectral regions from the bucketing and normalization processes. The bucketing process generates an X data matrix with a number of columns corresponding to the number of buckets and a number of rows corresponding to the total number of samples used.

Data sets are imported into a statistics program for analysis (e.g., SIMCA P 11.0 software from Umetrics AB, Umeå, Sweden). First, data are preprocessed to give equal weight to metabolites present at high and low concentrations. Then, data are first analyzed using principal component analysis (PCA) (66,67). This unsupervised multivariate data reduction routine serves to evaluate the quality of the data quickly and to identify possible outliers. In the typical case of a two-group study, the two groups first should be subjected to independent PCA analyses. Outliers in each group might be due to incorrect spectral referencing, poor data quality (e.g., because of suboptimal shims, phase errors), or occasionally the presence of contaminating signals (e.g., chemical impurities, electronic “parasites”) that were not removed at an earlier stage of spectrum processing. This procedure is very useful for identifying samples that are contaminated with ethanol or fixing agents. Spectra from these contaminations usually appear unmistakably in the score plot of the first two principal components. The spectra of these outliers should be inspected visually and either corrected or removed from the analysis. After PCA analysis, a supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA) (67–69) is usually

## 510 *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

employed to build a statistical model that optimizes the separation between the two groups. The number of components of the PLS-DA model is determined by cross-validation. The class membership of each sample is iteratively predicted, using the results to generate a goodness of fit measure,  $Q^2$ , for the overall model. The maximum theoretical value for  $Q^2$  is equal to 1 for perfect prediction. However, a  $Q^2$  value superior to 0.5 is generally considered to be a decent predictor. Because in practice PLS-DA models are often built using a relatively small number of samples compared with the number of variables, an extensive cross-validation of the model is mandatory to avoid overfitting of the data (70).

The combination of PCA and PLS-DA has become the universally used standard approach to this type of analysis (40,50). However, more sophisticated statistical methods such as hierarchical cluster analysis, K-nearest neighbor analysis, or neural networks are also in use (71). Further details of statistical methods can be found in Chapters 4 through 10.

### **7. Sample Reproducibility in High-Resolution Magic Angle Spinning**

When studying cohorts of humans by tissue HR-MAS, it is essential to ensure a high level of reproducibility for all samples belonging to a specific group, for all groups. This includes separate validation for control (healthy) and diseased tissues because the two might behave slightly differently with respect to reproducibility. While setting up a statistical model, detailed histopathological results should be available for all samples to ascertain the exact characteristics of the tissue type in question. The contribution of histopathologists is crucial at all stages of the study. In this section, we present two examples of reproducibility studies based on different human tissues.

#### **7.1. Epilepsy**

Thirty-seven 1D  $^1\text{H}$  CPMG spectra of healthy human cerebral cortex were obtained from patients with epilepsy who had undergone surgical removal of the hippocampus (Figure 23.5). This set of spectra shows convincingly that the protocol described in this chapter can be used to obtain highly reproducible brain tissue spectra. Because no normalization with respect to sample weight was applied for the display of these spectra, the globally constant signal intensities across all spectra indicate that the weight of biopsy specimens was rather constant. Sample contamination by ethanol is visible in some spectra (peaks at 1.18 ppm and 3.65 ppm). Because these contaminations were not very large, the corresponding spectral regions were simply set to zero in all the spectra for statistical evaluation. The corresponding PCA analysis is shown in Figure 23.6. Only the first two principal components of the PCA model are shown because they account for the largest variability in the sample. In this example, the first and the second component (PC1 and PC2) account for 18% and 14% of the variability. Most of the spectra fell within the Hotelling T2 ellipse shown, with a confidence level of 95%. Only two data points fell outside the T2 ellipse. The corresponding outlier spectra showed slightly abnormal intensities at 2.19 ppm and 3.5 ppm, which probably explain the nontypical behavior of the two points in the PCA plot.

## 7. Sample Reproducibility in High-Resolution Magic Angle Spinning

511

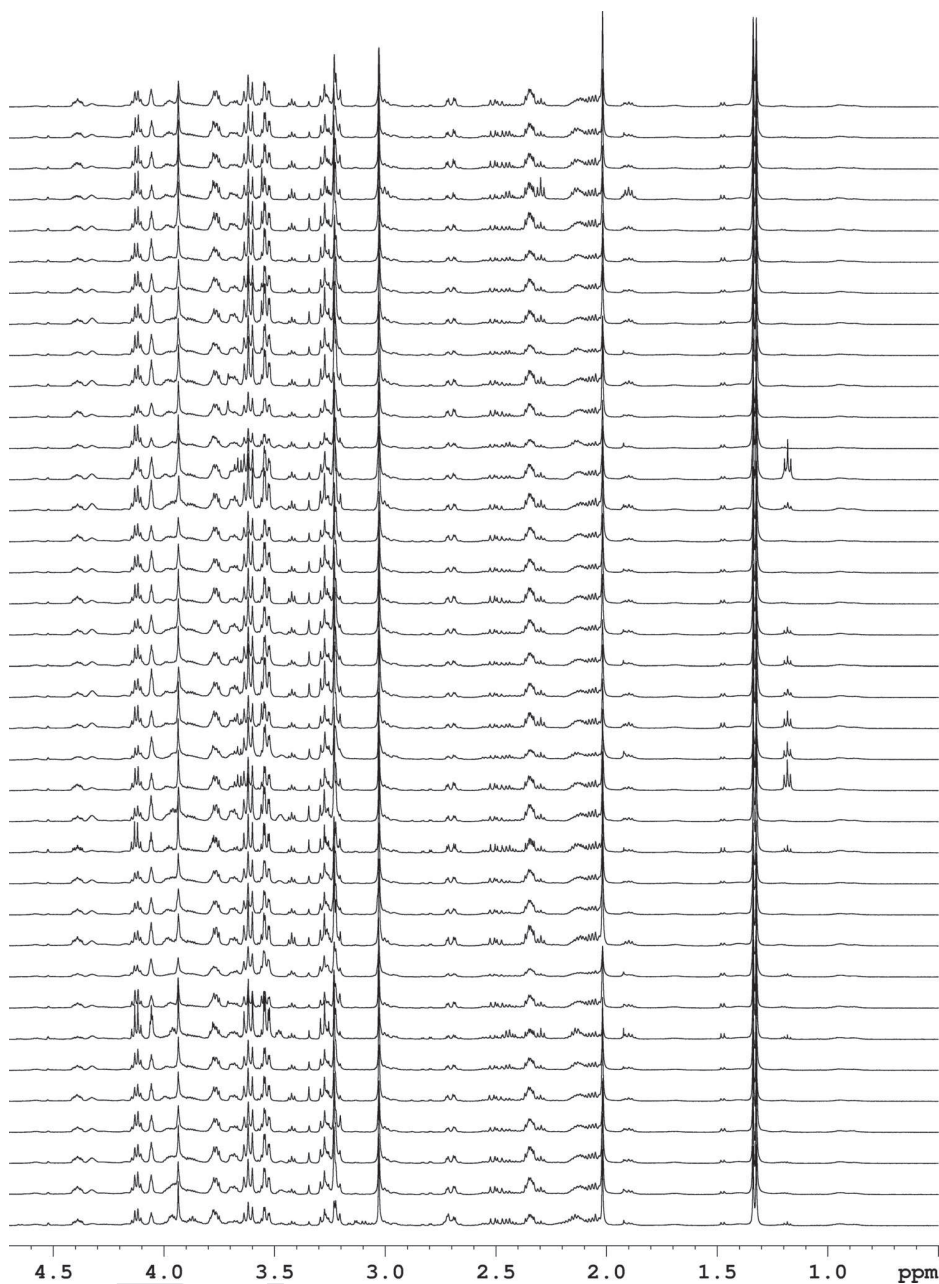


Figure 23.5. Stacked plot of 1D <sup>1</sup>H HR-MAS CPMG spectra of healthy human cortex biopsy specimens originating from 37 different patients.

### 7.2. Normal Kidney Tissue and Renal Cell Carcinoma

1D <sup>1</sup>H CPMG spectra of healthy kidney and renal cell carcinoma biopsy samples were acquired, originating from 20 different patients. Clear or conventional renal cell carcinomas represent 75% to 80% of renal cell carcinomas, the latter accounting for about 90% of adult renal tumors (72–74). From each patient, one healthy

512 *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

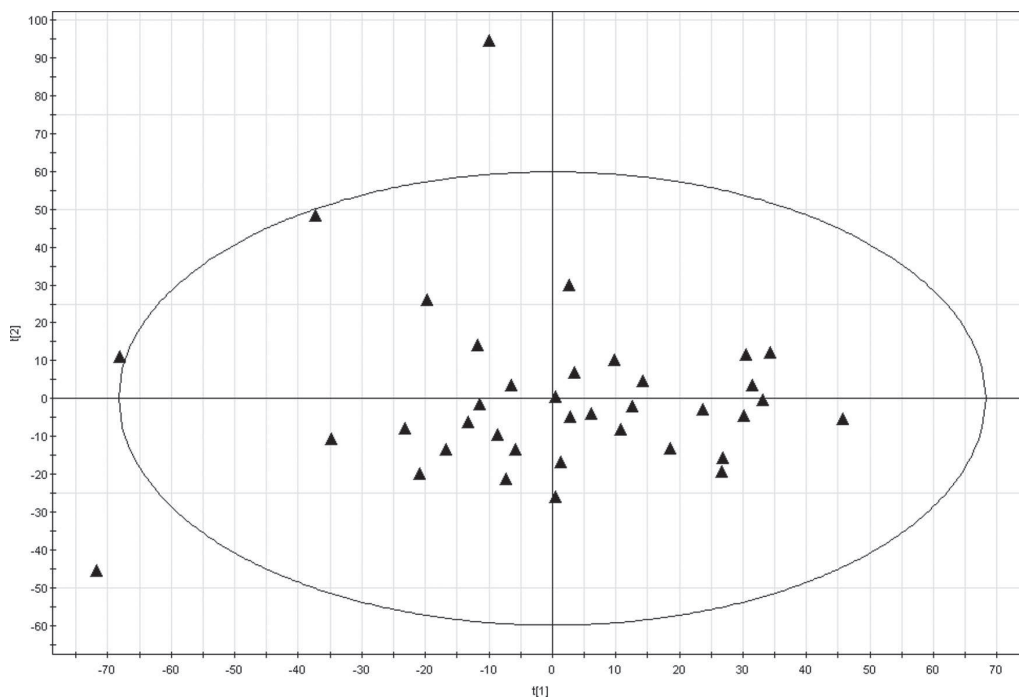


Figure 23.6. PCA analysis of the spectra shown in Figure 23.5 corresponding to 37 healthy human cortex biopsy specimens (spectral region corresponding to the ethanol resonances set to zero).

and one cancerous biopsy specimen were taken. The data presented in Figure 23.7 show the reproducibility of these spectra across the patient cohort (ethanol contamination is observable for several samples). Visual inspection of these spectra immediately reveals the existence of differences in metabolic signatures between control and clear renal cell carcinoma tissues. The cancerous samples are clearly characterized by a conspicuously intense lipid peak at 0.9 ppm. Table 23.2 presents detailed assignments of metabolites detected in healthy kidney tissue.

To ascertain further the reproducibility of the method, the average concentration of selected metabolites was evaluated for the 20 healthy human kidney samples presented in Figure 23.7. Metabolite concentrations were obtained from each spectrum by simply integrating the areas under individual peaks representing the resonances of the metabolites being analyzed. Only metabolites presenting at least one resonance with sufficient spectral resolution were selected for this analysis. A more robust but also more time-consuming protocol using the software LCModel (64) or jMRUI (65) would lead to more reliable results (see Section 5 on data analysis and signal assignment). Nevertheless, the results presented in Table 23.3 show very reasonable standard deviations for the metabolite concentrations evaluated.

The corresponding PCA analysis of these two sets of spectra, based on 0.01 ppm bucketing, is shown in Figure 23.8. Only the first two principal components of the PCA model are shown because they account for the largest variability in the sample. For the cancerous tissue samples (Figure 23.8(a)), PC1 and PC2 account for 19% and 9% of the variability. This data set is unusually large and contains 139

### 7. Sample Reproducibility in High-Resolution Magic Angle Spinning

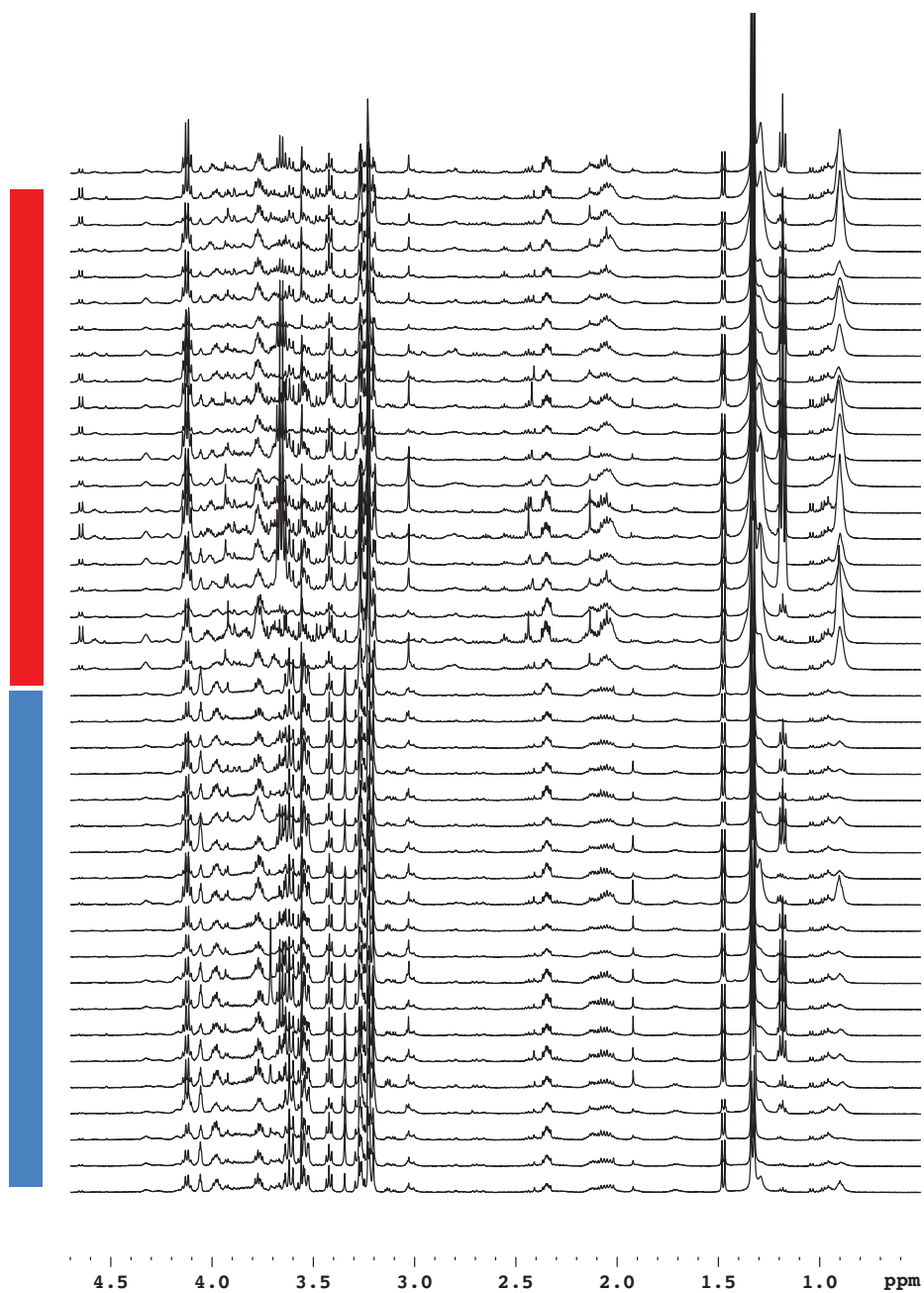


Figure 23.7. Stacked plot of 1D HR-MAS CPMG spectra of control kidney biopsy samples (blue) and clear renal cell carcinoma tissue (red).

spectra. As in the previous example (Section 7.1 on epilepsy), most of these spectra fell within the Hotelling T2 ellipse. Only four data points fell slightly outside the T2 ellipse. For the corresponding control tissues (Figure 23.8(b)), PC1 and PC2 account for 19% and 14% of the variability (119 spectra; 9 outside the T2 ellipse).



514 *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

Table 23.2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignment of metabolites present in healthy human kidney biopsy specimens

Metabolites	Group	$^1\text{H}$ Chemical shift (ppm)	$^{13}\text{C}$ Chemical shift (ppm)
Acetate	$\text{CH}_3$	1.92	25.97
Alanine	$\beta\text{CH}_3$	1.48	18.81
	$\alpha\text{CH}$	3.78	53.22
Arginine	$\alpha\text{CH}_2$	1.70	26.75
	$\alpha\text{CH}_2$	1.92	30.15
	$\delta\text{CH}_2$	3.21	43.27
Ascorbate	$\text{CH}_2(\text{OH})$	4.02	72.12
	$\text{C}_4\text{H}$	4.52	81.25
Asparagine	$\text{CH}$	4.00	54.15
	$\text{CH}_2$	2.94	37.43
	$\text{CH}_2$	2.84	37.35
Aspartate	$\text{CH}_2$	2.70	39.17
	$\text{CH}_2$	2.80	39.17
	$\text{CH}_2$	3.90	54.93
	$\text{CH}_2$	3.90	54.93
Choline	$\text{N}-(\text{CH}_3)$	3.21	56.75
	$\text{CH}_2$	3.52	69.96
	$\text{CH}_2$	4.06	58.27
Creatine	$\text{CH}_3$	3.03	39.64
	$\text{CH}_2$	3.93	56.36
Ethanolamine	$\text{CH}_2$	3.80	60.57
	$\text{CH}_2$	3.13	44.18
Fatty acids (a)	$\text{CH}_2$	1.29	34.53
	$\text{CH}_2$	1.31	25.36
Fatty acids (b)	$\text{CH}_2$	2.03	27.35
	$\text{CH}_2$	2.80	28.16
	$\text{CH}$	5.33	130.51
	$\text{CH}$	5.33	132.2
Fatty acids	$\text{CH}_3$	0.90	16.96
	$\text{CH}_2\text{-CO}$	2.25	36.43
Fatty acids (a) (b)	(n) $\text{CH}_2$	1.29	32.4
Fatty acids (c)	$\text{CH}_2$	1.60	27.3
GABA	$\text{CH}_2$	2.30	–
$\alpha$ -Glucose	$\text{C}_4\text{H}$	3.43	72.58
	$\text{C}_1\text{H}$	5.23	94.44
	$\text{CH}$	3.84	59.12
$\beta$ -Glucose	$\text{C}_3\text{H}, \text{C}_5\text{H}$	3.47	78.44
	$\text{C}_6\text{H}$	3.75	63.44
	$\text{C}_6\text{H}$	3.89	63.44
	$\text{C}_1\text{H}$	4.65	98.7
Glutamate	$\text{CH}_2$	2.05	29.74
	$\text{CH}_2$	2.34	35.95
	$\text{CH}$	3.76	57.2
Glutamine	$\text{CH}_2$	2.14	29.52
	$\text{CH}_2$	2.44	33.48
	$\text{CH}_2$	3.77	57.38
Glycerol	$1,3\text{CH}_2\text{OH}$	3.56	65.09
	$1,3\text{CH}_2\text{OH}$	3.65	65.09
	$\text{CHOH}$	3.78	74.85
Glycerophosphocholine	$\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	3.23	56.75
	$\alpha\text{CH}_2$	4.32	62.19
	$\beta\text{CH}_2$	3.69	68.5

(continued)

7. Sample Reproducibility in High-Resolution Magic Angle Spinning

515

Table 23.2 (continued)

Metabolites	Group	<sup>1</sup> H Chemical shift (ppm)	<sup>13</sup> C Chemical shift (ppm)
Glycine	CH <sub>2</sub>	3.56	44.09
Isoleucine	CH <sub>3</sub>	0.94	13.79
	CH <sub>3</sub>	1.01	17.29
	CH <sub>2</sub>	1.51	27.30
	CH	3.65	62.34
Lactate	CH <sub>3</sub>	1.33	22.7
	CH	4.12	71.11
Leucine	CH <sub>3</sub>	0.95	23.43
	CH <sub>3</sub>	0.91	24.52
	CH	1.70	26.78
	CH <sub>2</sub>	1.70	42.37
	CH	3.73	56.06
Lysine	CH <sub>2</sub>	1.43	24.21
	CH <sub>2</sub>	1.71	29.10
	CH <sub>2</sub>	1.89	32.56
Methionine	CH <sub>3</sub>	2.12	16.61
	CH <sub>2</sub>	2.18	32.72
	CH <sub>2</sub>	2.64	31.50
	CHNH <sub>2</sub>	3.85	56.84
Myo-inositol	C <sub>5</sub> H	3.27	77.00
	C <sub>1</sub> H, C <sub>3</sub> H	3.54	73.84
	C <sub>4</sub> H, C <sub>6</sub> H	3.61	75.06
	C <sub>2</sub> H	4.06	74.85
Phenylalanine	CH <sub>2,6</sub>	7.30	131.81
	C <sub>4</sub>	7.37	131.49
Phosphocholine	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3.22	56.52
	CH <sub>2</sub>	3.60	68.98
	CH <sub>2</sub>	4.16	60.60
Phosphoethanolamine	CH <sub>2</sub>	3.98	63.05
	CHNH <sub>2</sub>	3.22	43.35
Proline	CH <sub>2</sub>	3.32	48.83
	CH <sub>2</sub>	3.41	48.83
	CH	4.10	64.39
Scyllo-inositol	All HS	3.35	76.32
Serine	CH	3.84	59.12
	CH	3.97	62.88
Taurine	CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	3.26	50.13
	CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub>	3.42	38.06
Threonine	CH	3.60	63.04
	CH	4.24	68.67
	CH <sub>3</sub>	1.32	22.30
Tyrosine	CH	3.92	58.72
	CH <sub>3,5</sub>	6.87	118.50
	CH <sub>2,6</sub>	7.16	133.37
Valine	CH <sub>3</sub>	0.98	19.16
	CH <sub>3</sub>	1.04	20.65
	CH	2.30	31.94

Note. The nomenclature used for fatty acids is defined by Martínez-Bisbal et al. (15).

516 **Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques**

Table 23.3. *Average concentrations and standard deviations of selected metabolites present in healthy human kidney biopsy specimens*

Metabolites	Average concentration (mmol*kg <sup>-1</sup> )	Standard deviation
Acetate	0.46	0.12
Alanine	1.69	0.31
Ascorbate	0.20	0.06
Asparagine	6.08	0.95
Aspartate	0.71	0.18
Choline	0.70	0.14
Ethanolamine	0.67	0.15
Glutamate	2.43	0.53
Glutamine	0.46	0.10
Glycine	3.50	0.52
Lactate	7.15	1.83
Lysine	1.10	0.16
<i>Myo</i> -inositol	3.94	1.21
<i>Scyllo</i> -inositol	2.62	1.14
Taurine	2.71	0.35
Valine	0.21	0.04

**8. Metabolic Tissue Profiling by High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**

The purpose of clinical metabolic tissue profiling is to gain information on the metabolic pathways active in different tissues and for different pathologies and to establish correlations between the patients' metabolic data and their clinical evolution. This is particularly important for pathologies and patients where a discrepancy exists between histopathological diagnosis and clinical evolution. Some promising results for human brain tumors have appeared more recently in the literature (14). These results show that for some intermediate oligodendroglioma and glioblastoma cases, metabolic results are better correlated with the evolution of the patient than the corresponding histopathological data. These results are preliminary and need to be confirmed by complementary studies; however, they already open very interesting perspectives. As a first step, being able to differentiate healthy tissue from apparently healthy tissue infiltrated by cancer cells is an important issue; this is not only interesting from a biological point of view but also for possible applications such as real-time metabolic analysis of tissues in the context of a surgical operation (83). This type of application, if validated clinically, could be of great importance in the case of brain surgery because it would allow the surgeon to delineate exactly the tumorous part of the tissue. Figures 23.8 and 23.9 illustrate the potential of future applications of the procedures described in this chapter to tissue metabolic profiling. Simple PLS-DA analysis of the kidney data (Figure 23.8) proves that distinction between healthy and cancerous kidney tissues can be readily achieved. The PLS-DA score plot of the two principal components shows clear separation between the two sets of data (Figure 23.9). Numerous results published in the literature prove that this methodology can be successfully applied to several different organs. Particularly promising results have been obtained for prostate (22,75,76), breast

8. Metabolic Tissue Profiling by High-Resolution

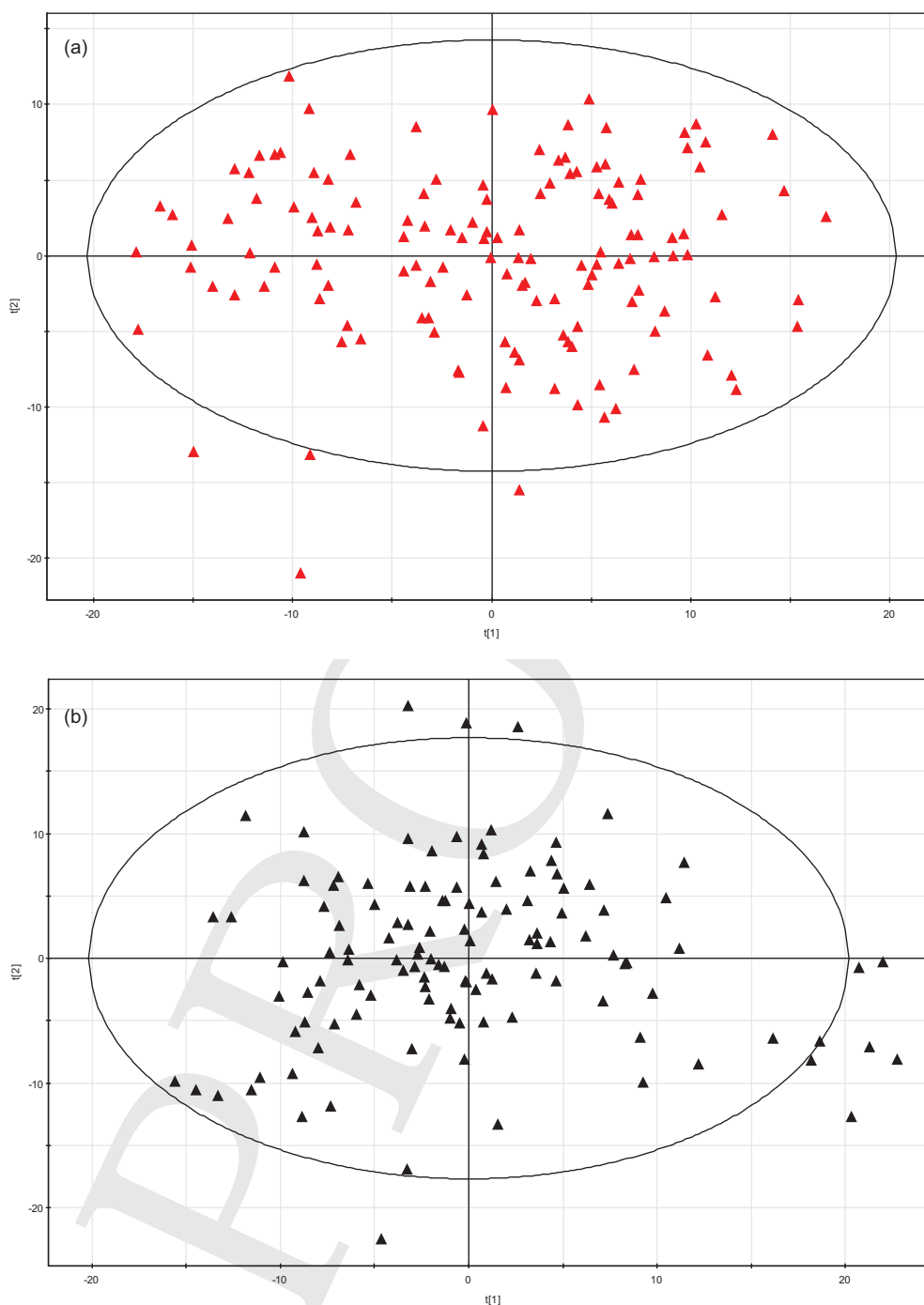


Figure 23.8. Principal component analysis of control (a) and clear cell adenocarcinoma (b) kidney tissue, based on 1D HR-MAS CPMG spectra (see also Figure 23.7).

518 *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

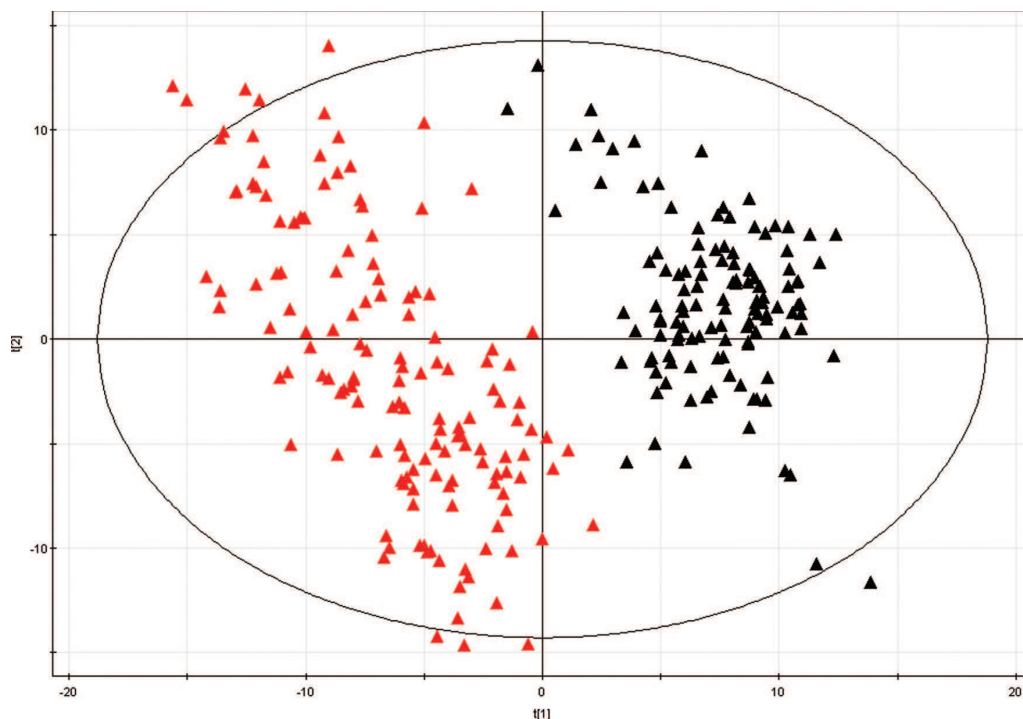


Figure 23.9. PLS-DA analysis of control kidneys (*black triangles*) and clear renal cell carcinoma kidney biopsy specimens (*black boxes*) (see also Figures 23.7 and 23.8).

(16,58,77), brain (13,15,78), kidney (26,27), colon (32,34,79,80), and cervical cancers (30,81,82).

### 9. Conclusion

Standardization of protocols for reliable tissue metabolic profiling of human biopsy samples can be achieved in such a way to be compatible with the constraints of a hospital environment. For this purpose, numerous precautions must be taken during the whole chain of events between sample collection and statistical data analysis. Because this type of tissue analysis involves human samples, the participation of physicians and other medical personnel is crucial to the success of the procedure. The modifications of standard medical protocols that are required for robust metabolic profiling by HR-MAS are minor and should be easily implemented in many hospitals. One of the future axes of development will be the full automation of the HR-MAS measurement process. This development not only will save time and manpower but also will ensure better reproducibility of HR-MAS data. Full automation will also allow hospital laboratory personnel to perform these analyses independently. The development of refrigerated HR-MAS sample changers greatly facilitates this task. This also applies to future developments regarding automatic tuning and matching of the HR-MAS probe and automatic gradient shimming of the sample (53,55). At a later stage, dedicated robots could be envisaged to automate

## Acknowledgments

519

the sample preparation process. Finally, when reliable statistical models representative of different tumor types and organs have been developed, these should become an integral part of medical HR-MAS spectrometers, making it possible to evaluate specific biopsy specimens in a fully automatic mode.

## Acknowledgments

This work is part of the CARMEN project and was supported by grants from University Hospitals of Strasbourg, University of Strasbourg, Bruker BioSpin, Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de Strasbourg, and Conseil Départemental du Bas-Rhin. The technical assistance of Dr. J. Raya, Mrs. H. Kada and Mrs. T. Tong is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- (1) Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G., Removal of dipolar broadening of Nuclear Magnetic Resonance spectra of solids by specimen rotation, *Nature* 1958, *183*, 1802.
- (2) Lowe, I. J., Free induction decays of rotating solids, *Phys. Rev. Lett.* 1959, *2*, 285.
- (3) Lippens, G.; Bourdonneau, M.; Dhalluin, C.; Warras, R.; Richert, T.; Seetharaman, C.; Boutillon, C.; Piotto, M., Study of compounds attached to solid supports using High Resolution Magic Angle Spinning NMR, *Curr. Org. Chem.* 1999, *3*, 147.
- (4) Filtch, W. L.; Dettre, G.; Holmes, C. P.; Shoolery, J.; Keifer, P. A., High-Resolution  $^1\text{H}$  NMR in Solid-Phase Organic Synthesis, *J. Org. Chem.* 1994, *59*, 7955.
- (5) Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Zilliox, M., Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry: MAS CH Correlation in Solvent-Swollen Resin, *J. Org. Chem.* 1995, *60*, 2650.
- (6) Keifer, P. A., Influence of resin structure, tether length and solvent upon the High resolution  $^1\text{H}$  NMR spectra of solid-phase synthesis resin, *J. Org. Chem.* 1996, *61*, 1558.
- (7) Doskocilova, D.; Tao, D.; Schneider, B., Effects of macroscopic spinning upon linewidth of NMR signals of liquids in magnetically inhomogeneous systems, *Czech. J. Phys. B.* 1975, *25*, 202.
- (8) Elbayed, K.; Furrer, J.; Raya, J.; Hirschinger, J.; Bourdonneau, M.; Richert, T.; Piotto, M., Origin of the residual NMR linewidth of a peptide bound to a resin under magic angle spinning, *Journal of Magnetic Resonance* 1999, *136*, 127.
- (9) Cheng, L. L.; Lean, C. L.; Bogdanova, A.; Wright Jr, S. C.; Ackerman, J. L.; Brady, T. J.; Garrido, L., Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning, *Magnetic Resonance in Medicine* 1996, *36*, 653.
- (10) Cheng, L. L.; Ma, M. J.; Becerra, L.; Ptak, T.; Tracey, I.; Lackner, A.; Gonzalez, R. G., Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, *94*, 6408.
- (11) Cheng, L. L.; Chang, I. W.; Louis, D. N.; Gonzalez, R. G., Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens, *Cancer Research* 1998, *58*, 1825.

520 **Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques**

- (12) Cheng, L. L.; Anthony, D. C.; Comite, A. R.; Black, P. M.; Tzika, A. A.; Gonzalez, R. G., Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy, *Neuro-Oncology* 2000, 2, 87.
- (13) Tzika, A. A.; Cheng, L. L.; Goumnerova, L.; Madsen, J. R.; Zurakowski, D.; Astrakas, L. G.; Zarifi, M. K.; Scott, R. M.; Anthony, D. C.; Gonzalez, R. G.; Black, P. M., Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Neurosurgery* 2002, 96, 1023.
- (14) Erb, G.; Elbayed, K.; Piotto, M.; Raya, J.; Neuville, A.; Mohr, M.; Maitrot, D.; Kehrli, P.; Namer, I. J., Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics, *Magnetic Resonance in Medicine* 2008, 59, 959.
- (15) Martínez-Bisbal, M. C.; Martí-Bonmati, L.; Piquer, J.; Revert, A.; Ferrer, P.; Llácer, J. L.; Piotto, M.; Assemat, O. Celda, B., <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo <sup>1</sup>H MRS study of human high grade gliomas, *NMR in Biomedicine* 2004, 17, 191.
- (16) Sitter, B.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Halgunset, J.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S., Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters, *NMR in Biomedicine* 2006, 19, 30.
- (17) Sitter, B.; Sonnewald, U.; Spraul, M.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S., High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue, *NMR in Biomedicine* 2002, 15, 327.
- (18) Gribbestad, I. S.; Sitter, B.; Lundgren, S.; Krane, J.; Axelson, D., Metabolite composition in breast tumors examined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Anticancer Research* 1999, 19, 1737.
- (19) Borgan, E.; Sitter, B.; Lingjærde, O. C.; Johnsen, H.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Sørli, T.; Børresen-Dale, A.; Gribbestad, I. S., Merging transcriptomics and metabolomics – advances in breast cancer profiling, *BMC Cancer* 2010, 10, 128.
- (20) Moestue, S. A.; Borgan, E.; Huuse, E. M.; Lindholm, E. M.; Sitter, B.; Børresen-Dale, A. L.; Engebraaten, O.; Mælandsmo, G. M.; Gribbestad, I. S., Distinct choline metabolic profiles are associated with differences in gene expression for basal-like and luminal-like breast cancer xenograft models, *BMC Cancer* 2010, 10, 433.
- (21) Sitter, B.; Bathen, T. F.; Singstad, T. E.; Fjøsne, H. E.; Lundgren, S.; Halgunset, J.; Gribbestad, I. S., Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy, *NMR in Biomedicine* 2010, 23, 424.
- (22) Swanson, M. G.; Vigneron, D. B.; Males, R. G.; Kurhanewicz, J.; Tabatabai, Z. L.; Schmitt, L.; Carroll, P. R.; James, J. K.; Hurd, R. E.; Swanson, M. G., Proton HR-MAS Spectroscopy and Quantitative Pathologic Analysis of MRI/3D-MRSI-Targeted Postsurgical Prostate Tissues, *Magnetic Resonance in Medicine* 2003, 50, 944.
- (23) Cheng, L. L.; Wu, C.-L.; Smith, M. R.; Gonzalez, R. G., Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS <sup>1</sup>H NMR spectroscopy at 9.4 T, *FEBS Letters* 2001, 494, 112.
- (24) Swindle, P.; Ramadan, S.; Stanwell, P.; McCredie, S.; Russell, P.; Mountford, C., Proton magnetic resonance spectroscopy of the central, transition and peripheral zones of the prostate: Assignments and correlation with histopathology, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2008, 21, 423.
- (25) Van Asten, J. J. A.; Cuijpers, V.; Hulsbergen-Van De Kaa, C.; Soede-Huijbregts, C.; Witjes, J. A.; Verhofstad, A.; Heerschap, A., High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy for metabolic assessment of cancer presence and Gleason score in human prostate needle biopsies, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2008, 21, 435.

## References

521

- (26) Moka, D.; Vorreuter, R.; Schicha, H.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Lipinsky, M.; Foxall, P. J. D.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Intact Kidney Tissue Samples, *Anal. Commun.* 1997, *34*, 107.
- (27) Tate, A. R.; Foxall, P. J. D.; Holmes, E.; Moka, D.; Spraul, M.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of  $^1\text{H}$  magic angle spinning (MAS) NMR spectra, *NMR in Biomedicine* 2000, *13*, 64.
- (28) Imperiale, A.; Elbayed, K.; Moussallieh, F. M.; Neuville, A.; Piotto, M.; Bellocq, J. P.; Lutz, P.; Namer, I. J., Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by  $^1\text{H}$ -high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy, 2011, *Pediatr Blood & Cancer* *56*, 24.
- (29) Mountford, C. E.; Delikatny, E. J.; Dyne, M.; Holmes, K. T.; Mackinnon, W. B.; Ford, R.; Hunter, J. C.; Truskett, I. D.; Russell, P., Uterine cervical punch biopsy specimens can be analyzed by  $^1\text{H}$  MRS, *Magnetic Resonance in Medicine* 1990, *13*, 324.
- (30) Mahon, M. M.; Cox, I. J.; Dina, R.; Soutter, W. P.; McIndoe, G. A.; Williams, A. D.; DeSouza, N. M.,  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy of preinvasive and invasive cervical cancer: In vivo-ex vivo profiles and effect of tumor load, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2004, *19*, 356.
- (31) Dave, U.; Taylor-Robinson, S. D.; Walker, M. M.; Mahon, M.; Puri, B. K.; Thursz, M. R.; Desouza, N. M.; Cox, I. J., In vitro  $^1\text{H}$ -magnetic resonance spectroscopy of Barrett's esophageal mucosa using magic angle spinning techniques, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004, *16*, 1199.
- (32) Piotto, M.; Moussallieh, F. M.; Dillmann, B.; Imperiale, A.; Neuville, A.; Brigand, C.; Bellocq, J. P.; Elbayed, K.; Namer, I. J., Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy, *Metabolomics* 2009, *5*, 292.
- (33) Chan, E. C. Y.; Koh, P. K.; Mal, M.; Cheah, P. Y.; Eu, K. W.; Backshall, A.; Cavill, R.; Nicholson, J. K.; Keun, H. C., Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS), *Journal of Proteome Research* 2009, *8*, 352.
- (34) Seierstad, T.; Røe, K.; Sitter, B.; Halgunset, J.; Flatmark, K.; Ree, A. H.; Olsen, D.; Gribbestad, I. S.; Bathen, T. F., Principal component analysis for the comparison of metabolic profiles from human rectal cancer biopsies and colorectal xenografts using high-resolution magic angle spinning  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy, *Molecular Cancer* 2008, *7*, 33.
- (35) Lindon, J. C.; Beckonert, O. P.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2009, *55*, 79.
- (36) Bathen, T. F.; Sitter, B.; Sjobakk, T. E.; Tessem, M.-B.; Gribbestad, I. S., Magnetic resonance metabolomics of intact tissue: A biotechnological tool in cancer diagnostics and treatment evaluation, *Cancer Research* 2010, *70*, 6692.
- (37) DeFeo, E. M.; Cheng, L. L., Characterizing human cancer metabolomics with ex vivo  $^1\text{H}$  HRMAS MRS, *Technology in Cancer Research and Treatment* 2010, *9*, 381.
- (38) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, *Nature Protocols* 2007, *2*, 2692.
- (39) Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Keun, H. C.; Craig, A.; Pearce, J. T. M.; Bruce, S. J.; Hardy, N.; Sansone, S. A.; Antti, H.; Jonsson, P.; Daykin, C.; Navarange, M.; Beger, R. D.; Verheij, E. R.; Amberg, A.; Baunsgaard, D.; Cantor, G. H.; Lehman-McKeeman, L.; Earll, M.; Wold, S.; Johansson, E.;



522 *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques*

- Haselden, J. N.; Kramer, K.; Thomas, C.; Lindberg, J.; Schuppe-Koistinen, I.; Wilson, I. D.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Senn, H.; Krotzky, A.; Kochhar, S.; Powell, J.; Van Der Ouderaa, F.; Plumb, R.; Schaefer, H.; Spraul, M., Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses, *Nature Biotechnology* 2005, 23, 833.
- (40) Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y.; Ebbels, T. M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues, *Nature Protocols* 2010, 5, 1019.
- (41) Carr, H. Y.; Purcell, E. M., Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments, *Phys. Rev.* 1954, 94, 630.
- (42) Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B. W.; Kleihues, P., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta Neuropathologica* 2007, 114, 97.
- (43) D'Adamo, Jr., A. F.; Peisach, J.; Manner, G.; Weiler, C. T., N acetyl aspartate amidohydrolase: purification and properties, *Journal of Neurochemistry* 1977, 28, 739.
- (44) D'Adamo, Jr., A. F.; Smith, J. C.; Woiler, C., The occurrence of N-acetylaspartate amidohydrolase (aminoacylase II) in the developing rat, *Journal of Neurochemistry* 1973, 20, 1275.
- (45) Opstad, K. S.; Bell, B. A.; Griffiths, J. R.; Howe, F. A., An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning (1)H NMR, *NMR in Biomedicine* 2008, 21, 1138.
- (46) Jordan, K. W.; He, W.; Halpern, E. F.; Wu, C.-L.; Cheng, L. L., Evaluation of tissue metabolites with high resolution magic angle spinning mr spectroscopy human prostate samples after three-year storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , *Biomarker Insights* 2007, 2007, 147.
- (47) Waters, N. J.; Garrod, S.; Farrant, R. D.; Haselden, J. N.; Connor, S. C.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: Optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition, *Analytical Biochemistry* 2000, 282, 16.
- (48) Wu, C. L.; Taylor, J. L.; He, W.; Zepeda, A. G.; Halpern, E. F.; Bielecki, A.; Gonzalez, R. G.; Cheng, L. L., Proton high-resolution magic angle spinning NMR analysis of fresh and previously frozen tissue of human prostate, *Magnetic Resonance in Medicine* 2003, 50, 1307.
- (49) Middleton, D. A.; Bradley, D. P.; Connor, S. C.; Mullins, P. G.; Reid, D. G., The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue, *Magnetic Resonance in Medicine* 1998, 40, 166.
- (50) Sitter, B.; Bathen, T. F.; Tessem, M. B.; Gribbestad, I. S., High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2009, 54, 239.
- (51) Piotto, M.; Elbayed, K.; Wieruszkeski, J. M.; Lippens, G., Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe, *Journal of Magnetic Resonance* 2005, 173, 84.
- (52) Findeisen, M.; Brand, T.; Berger, S., A  $^1\text{H}$ -NMR thermometer suitable for cryoprobes, *Magnetic Resonance in Chemistry* 2007, 45, 175.
- (53) Sukumar, S.; Johnson, M. O. N.; Hurd, R. E.; Zijl, P. C., Automated Shimming for Deuterated Solvents Using Field Profiling, *J. Magn. Reson.* 1997, 125, 159.
- (54) Zijl, P. C. M. v.; Sukumar, S.; Johnson, M. O. N.; Webb, P.; Hurd, R.E., Optimized shimming for high-resolution NMR using three-dimensional image-based field mapping, *J. Magn. Reson.* 1994, 111, 203.
- (55) Weiger, M.; Speck, T.; Fey, M., Gradient shimming with spectrum optimisation, *Journal of Magnetic Resonance* 2006, 182, 38.

## References

523

- (56) Elbayed, K.; Dillmann, B.; Raya, J.; Piotto, M.; Engelke, F., Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR, *Adv. Magn. Reson.* 2005, *174*, 2.
- (57) Piotto, M.; Bourdonneau, M.; Furrer, J.; Bianco, A.; Raya, J.; Elbayed, K., Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: Effect of radial B1 inhomogeneities, *J. Magn. Reson.* 2001, *149*, 114.
- (58) Bathen, T. F.; Jensen, L. R.; Sitter, B.; Fjøsne, H. E.; Halgunset, J.; Axelson, D. E.; Gribbestad, I. S.; Lundgren, S., MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status, *Breast Cancer Research and Treatment* 2007, *104*, 181.
- (59) Hong, Y. S.; Coen, M.; Rhode, C. M.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., Chemical shift calibration of 1HMAS NMR liver tissue spectra exemplified using a study of glycine protection of galactosamine toxicity, *Magnetic Resonance in Chemistry* 2009, *47*, S47.
- (60) Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M. A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; MacInnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H. J.; Querengesser, L., HMDB: The human metabolome database, *Nucleic Acids Research* 2007, *35*, D521.
- (61) Akoka, S.; Barantin, L.; Trierweiler, M., Concentration Measurement by proton NMR using the ERETIC method, *Anal. Chem.* 1999, *71* (13), 2554.
- (62) Wider, G.; Dreier, L., Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society* 2006, *128*, 2571.
- (63) Martinez-Bisbal, M. C.; Monleon, D.; Assemat, O.; Piotto, M.; Piquer, J.; Llacer, J. L.; Celda, B., Determination of metabolite concentrations in human brain tumour biopsy samples using HR-MAS and ERETIC measurements, *NMR Biomed* 2009, *22*, 199.
- (64) Provencher, S. W., Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra, *Magnetic Resonance in Medicine* 1993, *30*, 672.
- (65) Fauvelle, F.; Dorandeu, F.; Carpentier, P.; Foquin, A.; Rabeson, H.; Graveron-Demilly, D.; Arvers, P.; Testylier, G., Changes in mouse brain metabolism following a convulsive dose of soman: A proton HRMAS NMR study, *Toxicology* 2010, *267*, 99.
- (66) Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1987, *2*, 37.
- (67) Ebbels, T. M. D.; Cavill, R., Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2009, *55*, 361.
- (68) Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L., PLS-regression: A basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001, *58*, 109.
- (69) Tenenhaus, M., *La régression PLS: Théorie et Pratique.*, Editions Technip, Paris, France 1998.
- (70) Westerhuis, J. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Smit, S.; Vis, D. J.; Smilde, A. K.; Velzen, E. J. J.; Duijnhoven, J. P. M.; Dorsten, F. A., Assessment of PLS-DA cross validation, *Metabolomics* 2008, *4*, 81.
- (71) Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2001, *39*, 1.
- (72) Motzer, R. J.; Bander, N. H.; Nanus, D. M., Medical progress: Renal-cell carcinoma, *New England Journal of Medicine* 1996, *335*, 865.
- (73) Vogelzang, N. J.; Stadler, W. M., Kidney cancer, *Lancet* 1998, *352*, 1691.

524 **Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques**

- (74) Allan, J. P.; Amnon, Z.; Arie, S. B., The changing natural history of renal cell carcinoma, *Journal of Urology* 2001, *166*, 1611.
- (75) Cheng, L. L.; Wu, C. L.; Smith, M. R.; Gonzalez, R. G., Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS 1H NMR spectroscopy at 9.4 T, *FEBS Letters* 2001, *494*, 112.
- (76) Tomlins, A. M.; Foxall, P. J. D.; Lindon, J. C.; Lynch, M. J.; Spraul, M.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K., High resolution magic angle spinning 1H nuclear magnetic resonance analysis of intact prostatic hyperplastic and tumour tissues, *Analytical Communications* 1998, *35*, 113.
- (77) Cheng, L. L.; Chang, I. W.; Smith, B. L.; Gonzalez, R. G., Evaluating Human Breast Ductal Carcinomas with High-Resolution Magic-Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance* 1998, *135*, 194.
- (78) Barton, S. J.; Howe, F. A.; Tomlins, A. M.; Cudlip, S. A.; Nicholson, J. K.; Bell, B. A.; Griffiths, J. R., Comparison of in vivo 1H MRS of human brain tumours with 1H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 1999, *8*, 121.
- (79) Jordan, K. W.; Nordenstam, J.; Lauwers, G. Y.; Rothenberger, D. A.; Alavi, K.; Garwood, M.; Cheng, L. L., Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy, *Diseases of the Colon and Rectum* 2009, *52*, 520.
- (80) Tessem, M. B.; Selns, K. M.; Sjørnsen, W.; Tranø, G.; Giskeødegård, G. F.; Bathen, T. F.; Gribbestad, I. S.; Hofslø, E., Discrimination of patients with microsatellite instability colon cancer using <sup>1</sup>H HR MAS MR spectroscopy and chemometric analysis, *Journal of Proteome Research* 2010, *9*, 3664.
- (81) Delikatny, E. J.; Russell, P.; Hunter, J. C.; Hancock, R.; Atkinson, K. H.; Van Haften-Day, C.; Mountford, C. E., Proton MR and human cervical neoplasia: Ex vivo spectroscopy allows distinction of invasive carcinoma of the cervix from carcinoma in situ and other preinvasive lesions, *Radiology* 1993, *188*, 791.
- (82) Sitter, B.; Bathen, T.; Hagen, B.; Arentz, C.; Skjeldestad, F. E.; Gribbestad, I. S., Cervical cancer tissue characterized by high-resolution magic angle spinning MR spectroscopy, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2004, *16*, 174.
- (83) Piotto, M.; Moussallieh, F. M.; Neuville, A.; Bellocq, J. P.; Elbayed, K. & Namer, I. J., Towards real-time metabolic profiling of a biopsy specimen during a surgical operation by 1H high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 2012, *6*, 22.

# Caractérisation métabolomique des tissus épileptogènes par spectroscopie RMN à haute résolution à l'angle magique (RMN HRMAS): applications à l'épilepsie temporale humaine et animale

## RESUME

La métabolomique a pour objet l'identification et la quantification de métabolites dans un échantillon biologique. Cette discipline s'inscrit dans une approche du vivant connue sous le terme de « biologie des systèmes ». La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire haute résolution à l'angle magique (RMN HRMAS) est une méthode de choix pour l'obtention de ce type de profilage métabolique. L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est une épilepsie focale fréquente associée le plus souvent à des pertes neuronales sélectives, une gliose réactionnelle et une plasticité cellulaire spécifique. Bien que restant débattue, une origine neurométabolique reste un axe de recherche majeur. A ce jour une caractérisation métabolomique des tissus épileptogènes par RMN HRMAS reste à effectuer. Notre travail a consisté dans un premier temps à caractériser, chez le rat, les effets des méthodes de prélèvement et de fixation sur le métabolome cérébral dans le cadre des acquisitions RMN HRMAS. Dans un second temps, nous avons travaillé sur le modèle animal lithium-pilocarpine d'ELT. Nous avons pu décrire le métabolome issu des données RMN  $^1\text{H}$  HRMAS de différentes structures cérébrales impliquées dans l'épileptogénèse. Des analyses multivariées de type PLS-DA ont pu mettre en évidence des profils métaboliques pathologiques au sein du cortex entorhinal et de l'hippocampe. A l'aide de substrats marqués au carbone 13 ( $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et de  $[1,2-^{13}\text{C}]$ acétate) nous avons étudié les voies métaboliques neuronales et gliales. Nos résultats suggèrent l'absence d'anomalies métaboliques au sein des astrocytes. Enfin dans un dernier temps, nous avons effectué des analyses RMN  $^1\text{H}$  HRMAS sur près de 200 échantillons cérébraux de patients atteints d'ELT. Une analyse multivariée a permis de distinguer les profils métaboliques des hippocampes sclérosés et non sclérosés. En revanche la construction de modèles sur la base d'hypothèses clinico-métaboliques (durée de la maladie, fréquence de crises, antécédents de convulsions fébriles) n'a pas permis d'identifier de profils métaboliques spécifiques. L'ensemble de ces données suggère l'existence de profils métabolomiques distincts en fonction des caractéristiques neuropathologiques des patients atteints d'ELT. Notre travail confirme la nécessité d'une approche intégrée de type « biologie des systèmes » pour l'étude de l'ELT aussi bien chez l'homme que dans des modèles animaux.