



# INSA

N°d'ordre NNT : 2018LYSEI089

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'INSA Lyon**

**Ecole Doctorale N° ED-205**  
**Ecole doctorale interdisciplinaire science-santé**

**Spécialité de doctorat** : Recherche clinique, innovation technologique

Soutenance prévue le 28/11/2018, par :  
**Angéline Nemeth**

---

## **Développement et validation de stratégies de quantification lipidique par imagerie et spectroscopie proton à 3T : Application à l'étude de la surnutrition**

---

Devant le jury composé de :

Saint-Jalmes, Hervé	Professeur des Universités Praticien Hospitalier	Université Rennes	Rapporteur
Franconi, Florence	Ingénieur de recherche (HDR)	Université Angers	Rapporteuse
Bonny, Jean-Marie	Directeur de recherche INRA	Clermont-Ferrand	Examineur
Friboulet, Denis	Professeur des Universités	INSA-Lyon	Examineur
Tappy, Luc	Professeur des Universités	Université de Lausanne	Examineur
Beuf, Olivier	Directeur de recherche CNRS	INSA-Lyon	Directeur de thèse
Laville, Martine	Professeur des Universités Praticien Hospitalier	Université Lyon 1	Co-directrice de thèse
Ratiney, Hélène	Chargée de recherche CNRS	CNRS	Co-encadrante

**Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2016-2020**

<b>SIGLE</b>	<b>ECOLE DOCTORALE</b>	<b>NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE</b>
<b>CHIMIE</b>	<b>CHIMIE DE LYON</b> <a href="http://www.edchimie-lyon.fr">http://www.edchimie-lyon.fr</a> Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage <a href="mailto:secretariat@edchimie-lyon.fr">secretariat@edchimie-lyon.fr</a> INSA : R. GOURDON	<b>M. Stéphane DANIELE</b> Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon IRCELYON-UMR 5256 Équipe CDFA 2 Avenue Albert EINSTEIN 69 626 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a>
<b>E.E.A.</b>	<b>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</b> <a href="http://edeea.ec-lyon.fr">http://edeea.ec-lyon.fr</a> Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN <a href="mailto:ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr">ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr</a>	<b>M. Gérard SCORLETTI</b> École Centrale de Lyon 36 Avenue Guy DE COLLONGUE 69 134 Écully Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17 <a href="mailto:gerard.scorletti@ec-lyon.fr">gerard.scorletti@ec-lyon.fr</a>
<b>E2M2</b>	<b>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</b> <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a> Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : H. CHARLES <a href="mailto:secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr">secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr</a>	<b>M. Philippe NORMAND</b> UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:philippe.normand@univ-lyon1.fr">philippe.normand@univ-lyon1.fr</a>
<b>EDISS</b>	<b>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</b> <a href="http://www.ediss-lyon.fr">http://www.ediss-lyon.fr</a> Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : M. LAGARDE <a href="mailto:secretariat.ediss@univ-lyon1.fr">secretariat.ediss@univ-lyon1.fr</a>	<b>Mme Emmanuelle CANET-SOULAS</b> INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 Avenue Jean CAPELLE INSA de Lyon 69 621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax : 04.72.68.49.16 <a href="mailto:emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr">emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr</a>
<b>INFOMATHS</b>	<b>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</b> <a href="http://edinfomaths.universite-lyon.fr">http://edinfomaths.universite-lyon.fr</a> Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 Fax : 04.72.43.16.87 <a href="mailto:infomaths@univ-lyon1.fr">infomaths@univ-lyon1.fr</a>	<b>M. Luca ZAMBONI</b> Bât. Braconnier 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.26.23.45.52 <a href="mailto:zamboni@maths.univ-lyon1.fr">zamboni@maths.univ-lyon1.fr</a>
<b>Matériaux</b>	<b>MATÉRIAUX DE LYON</b> <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a> Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction <a href="mailto:ed.materiaux@insa-lyon.fr">ed.materiaux@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Jean-Yves BUFFIÈRE</b> INSA de Lyon MATEIS - Bât. Saint-Exupéry 7 Avenue Jean CAPELLE 69 621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28 <a href="mailto:jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr">jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr</a>
<b>MEGA</b>	<b>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</b> <a href="http://edmega.universite-lyon.fr">http://edmega.universite-lyon.fr</a> Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction <a href="mailto:mega@insa-lyon.fr">mega@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Jocelyn BONJOUR</b> INSA de Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69 621 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr">jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr</a>
<b>ScSo</b>	<b>ScSo*</b> <a href="http://ed483.univ-lyon2.fr">http://ed483.univ-lyon2.fr</a> Sec. : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.72.76 <a href="mailto:viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr">viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr</a>	<b>M. Christian MONTES</b> Université Lyon 2 86 Rue Pasteur 69 365 Lyon CEDEX 07 <a href="mailto:christian.montes@univ-lyon2.fr">christian.montes@univ-lyon2.fr</a>

# Résumé

L'imagerie et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (IRM et SRM) sont des méthodes non-invasives qui ont le potentiel d'estimer *in vivo* la quantité et la qualité des adiposités abdominales. Le contexte scientifique et clinique de ce manuscrit s'articule autour de l'étude de surnutrition « Poly-Nut » dont l'un des objectifs est d'analyser les évolutions des tissus adipeux (TA) dans une phase rapide de prise de poids. L'originalité et la complexité de cette thèse résident dans le développement, l'adaptation et la comparaison de plusieurs méthodes quantitatives d'IRM et de SRM, pour l'étude du signal lipidique dans un contexte clinique à 3T. La fiabilité et la validation des mesures obtenues *in vivo* par ces techniques font ici l'objet d'une étude approfondie. Pour l'analyse quantitative du signal de spectroscopie, différentes méthodes existantes ont été comparées à celle développée spécifiquement pour notre étude clinique. L'estimation paramétrique par moindres carrés non linéaires appliquée aux spectres RMN des lipides peut conduire, selon la fonction modèle utilisée, à un problème non linéaire mal posé. Nous montrons alors que l'utilisation d'un modèle simplifié se fondant sur la structure d'une chaîne de triglycéride, comme utilisé récemment en imagerie quantitative, constitue une solution valide au regard de l'état de l'art. Ensuite différentes méthodes (IRM, SRM, Dual Energy X-ray absorptiometry, chromatographie en phase gazeuse) ont été utilisées pour caractériser les TA sous-cutanés et viscéraux. Le suivi par IRM du contenu lipidique du foie ainsi que du volume et de la composition en acide gras des TA à partir d'une unique acquisition en multi-écho de gradient est démontré. Enfin des développements expérimentaux menés parallèlement à l'étude clinique sur un imageur préclinique à 4,7T, comparent différentes stratégies d'encodage du déplacement chimique par imagerie et caractérisent des méthodes SRM pour estimer *in vivo* la proportion d'oméga-3 dans les chaînes d'acides gras.

Mots clefs : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire *in vivo*, spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, estimation paramétrique, régression non linéaire, tissu adipeux, composition en acide gras, imagerie par résonance magnétique nucléaire

# Abstract

Magnetic resonance imaging and spectroscopy (MRI and MRS) are non-invasive methods that have the potential to estimate *in vivo* the quantity and the quality of abdominal adipose tissues (AT). The scientific and clinical context of this thesis is based on an overfeeding study entitled "Poly-Nut". One of the main objectives of this study is to analyze changes in adipose tissues in a rapid phase of weight gain. The originality and complexity of this thesis rely in the development, adaptation and comparison of several quantitative methods of MRI and MRS, for the study of lipid signal, in a clinical context, at 3T. The reliability and the validation of the measurements obtained *in vivo* using these techniques are the main subject of this PhD thesis. For the quantitative analysis of the spectroscopy signal, different existing methods have been compared to those developed specifically for our clinical study. According to the model function used, the nonlinear-least-squares parametric estimation applied to the lipid spectra can lead to an ill-posed nonlinear problem. We demonstrated that the use of a simplified model based on the structure of a triglyceride chain, as recently used in quantitative imaging, was a valid solution regarding the state of the art. Then different methods (MRI, MRS, Dual Energy X-ray absorptiometry, gas chromatography) were used to characterize the subcutaneous and visceral AT. We demonstrated the feasibility of MRI to follow the lipid content in the liver as well as the volume and the fatty acid composition of AT using a single multiple gradient-echo acquisition. Finally, experimental developments were carried out in parallel with the clinical study, on a 4.7T preclinical system, first, to compare different strategies for encoding the chemical shift using imaging and, secondly, to characterize MRS methods for *in vivo* estimation of the relative proportion of omega-3 among all fatty acids.

Key words: *in vivo*, nuclear magnetic resonance spectroscopy, parametric estimation, nonlinear regression, adipose tissue, fatty acid composition, nuclear magnetic resonance imaging, chemical shift-encoded imaging, overfeeding.

# Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Contexte clinique et scientifique.....</b>	<b>5</b>
1.1. Mécanisme de stockage des graisses dans l'organisme.....	6
1.1.1. Tissus adipeux blancs.....	6
1.1.2. Rôle de l'alimentation dans le stockage des graisses.....	11
1.2. Spectroscopie, imagerie et imagerie spectroscopique.....	12
1.2.1. Principe physique de la résonance magnétique nucléaire.....	12
1.2.2. Propriétés magnétiques de la graisse.....	17
1.2.3. Spectroscopie localisée.....	19
1.2.4. Imagerie.....	24
1.2.5. Imagerie spectroscopique.....	28
1.3. Les différents aspects de la quantification lipidique.....	30
1.3.1. Mesures volumétriques et anthropométriques.....	31
1.3.2. Taux de graisse.....	34
1.3.3. Proportions d'acide gras.....	36
Conclusion.....	42
<b>Chapitre 2 : Estimation de la composition en acide gras à partir du signal de spectroscopie</b>	<b>43</b>
2.1. Traitements des signaux de spectroscopie.....	44
2.2. Comparaison d'un modèle dérivé de l'imagerie avec un modèle classique pour l'estimation de la composition lipidique à partir du signal de spectroscopie.....	46
2.2.1. Introduction.....	47
2.2.2. Materials and methods.....	48
2.2.3. Results.....	55
2.2.4. Discussion.....	62
2.2.5. APPENDIX.....	67
Conclusion.....	70
<b>Chapitre 3 : Etude clinique Poly-nut.....</b>	<b>71</b>
3.1. Utilisation de la séquence multi-écho de gradient pour la quantification du contenu lipidique.....	73
3.1.1. Introduction.....	74
3.1.2. Materials and methods.....	75
3.1.3. Results.....	83

3.1.4. Discussion .....	91
3.2. Effet des polyphénols couplés à la surnutrition.....	95
3.2.1. Données anthropométriques .....	96
3.2.2. Effet sur le foie .....	97
3.2.3. Effet sur la composition lipidique des tissus adipeux.....	99
3.2.4. Discussion .....	102
Conclusion .....	102
<b>Chapitre 4 : Développements expérimentaux.....</b>	<b>105</b>
4.1. Quantification des omégas-3 par spectroscopie (PRESS).....	108
4.1.1. Protocole expérimental pour la caractérisation du spectre lipidique à 4,7T.....	108
4.1.2. Evolution du groupement méthyl selon le TE.....	110
4.1.3. Mesure des T2 de chaque pic et de la composition lipidique .....	112
4.1.4. Mesure de la proportion d'omégas 3 .....	117
4.2. J-édition (MEGA-PRESS).....	123
4.2.1. Application de la MEGA-PRESS en ciblant les groupements liés à la poly- insaturation .....	124
4.2.2. Application de la MEGA-PRESS en ciblant les groupements liés aux omégas-3 .. .....	125
4.2.3. Implémentation du spectre OFF .....	126
4.2.4. Conclusion.....	127
4.3. Imagerie spectroscopique EPSI : Comparaison avec la séquence MGE et la séquence PRESS .....	128
4.3.1. Lecture et correction du signal provenant de la séquence EPSI.....	128
4.3.2. Comparaison de la séquence EPSI-FID avec la séquence MGE.....	130
4.3.3. Comparaison des deux motifs d'EPSI : EPSI-FID et EPSI-SE.....	133
4.3.4. Comparaison de la séquence EPSI-SE avec la séquence PRESS.....	135
Conclusion .....	144
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>145</b>
<b>Publications et communications.....</b>	<b>149</b>
<b>Références .....</b>	<b>151</b>

# Glossaire

BMI	body mass index	(IMC)
CL	longueur moyenne de la chaîne carbonée	
CRLB	Cramér-Rao Lower Bound	(Borne de Cramér-Rao)
CSE-MRI	chemical shift encoded MR imaging	
CV	coefficient of variation	(coefficient de variation)
DEXA	dual energy X-ray absorptiometry	
EPSI	echo planar spectroscopic imaging	
FID	Free Induction Decay	(phénomène de précession libre)
FOV	field of view	(champ de vue)
IMC	indice de masse corporel	
IRM	imagerie par résonance magnétique	
MUFA	mono-unsaturated fatty acid	(acide gras mono-insaturé)
ndb	nombre moyen de double liaison	
nmldb	nombre moyen de méthylène interrompant de deux doubles liaisons	
PDFF	proton density fat fraction	(fraction de graisse en densité de proton)
PRESS	Point RESolved Spectroscopy	
PUFA	poly-unsaturated fatty acid	(acide gras polyinsaturé)
RF	radio fréquence	
RMN	résonance magnétique nucléaire	
RTH	rapport tour de taille sur tour de hanche	
SAT	subcutaneous adipose tissue	(tissu adipeux sous-cutané)
SFA	saturated fatty acid	(acide gras saturé)
SNR	Signal-to-Noise Ratio	(rapport signal sur bruit)
SRM	spectroscopie par résonance magnétique	
SRM	spectroscopie par résonance magnétique	
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode	
TAG	Triacylglycerol	triglyceride
TE	temps d'écho	
TF	transformée de Fourier	
TR	temps de répétition	
UFA	unsaturated fatty acid	(acide gras insaturé)
VAT	visceral adipose tissue	(tissu adipeux viscéral)





# Introduction générale

Le surpoids et l'obésité sont des enjeux de santé publique qui ont atteint un seuil épidémique avec près de 2,8 millions de décès chaque année (Organisme mondiale de la Santé 2017). Les principales causes d'excès de poids sont une alimentation trop riche en matières grasses et en sucres couplée à un mode de vie sédentaire: cela entraîne une balance énergétique positive avec un excès de calories, qui est par la suite stocké dans l'organisme. En 2016, un rapport sur la cohorte « Constances » estimait, qu'en France, environ 16% de la population adulte était obèse et que la prévalence du surpoids était de 41% chez les hommes et de 25% chez les femmes (Matta et al. 2016). L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure simple qui est couramment utilisée pour estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte. Il correspond à la masse divisée par le carré de la taille et est exprimé en  $\text{kg/m}^2$ . Une personne est considérée en surpoids quand son IMC est compris entre  $25 \text{ kg/m}^2$  et  $30 \text{ kg/m}^2$  et obèse pour un IMC supérieur à  $30 \text{ kg/m}^2$ . Un IMC élevé a souvent été associé à un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires. Cependant, l'utilisation de l'IMC comme seul indicateur de santé conduit souvent à une mauvaise classification de la présence de facteurs de risques cardio-métaboliques (Tomiyama et al. 2016). Ces dernières années, la notion de syndrome métabolique est apparue et désigne l'association d'anomalies cliniques et biologiques pouvant accroître le risque de développer des maladies liées au métabolisme comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou encore les stéatoses hépatiques non-alcooliques. Plusieurs critères ont été définis et placent l'adiposité abdominale et la résistance à l'insuline au centre de ce syndrome. Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme un simple lieu de stockage des lipides alors qu'il se révèle être un véritable organe endocrine capable d'évoluer et de s'adapter à nos régimes alimentaires. Il devient alors nécessaire de développer de nouvelles techniques permettant d'analyser l'adiposité abdominale de façon fiable.

Dans ce contexte, ce manuscrit décrit des méthodes non-invasives basées sur la résonance magnétique du noyau d'hydrogène (RMN) : l'imagerie (IRM) et la spectroscopie (SRM). Nous étudions la faisabilité de détecter des changements volumétriques et qualitatifs (nature des acides gras : saturés (SFA), mono-insaturés (MUFA) ou polyinsaturés (PUFA)) des adiposités abdominales et du foie, plus particulièrement, dans la phase de prise de poids. Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres.

Le premier chapitre du manuscrit décrit le contexte scientifique et clinique de l'étude de surnutrition « Poly-Nut » dont l'un des objectifs est d'analyser les évolutions des tissus adipeux (TA) dans une phase rapide de prise de poids. Le mécanisme de stockage des graisses dans l'organisme est alors abordé en spécifiant plus particulièrement le fonctionnement du tissu adipeux blanc mais aussi le rôle de l'alimentation dans la prise de poids ainsi que l'effet de certains compléments alimentaires comme les polyphénols. S'en suit une description du phénomène physique de la résonance magnétique nucléaire et des séquences d'imagerie et de spectroscopie nécessaires à la compréhension du manuscrit. Ce premier chapitre se termine par un état de l'art des différentes techniques de quantification lipidique que ce soit des mesures anthropométriques (IMC, rapport tour de taille sur tour de hanche : RTH), des mesures volumiques par imagerie (Dual Energy X-ray absorptiometry : DEXA, IRM) ou des mesures qualitatives des graisses (chromatographie en phase gazeuse : GC, SRM ou encore IRM).

Le deuxième chapitre est dédié à l'analyse du signal de spectroscopie dans le cas de l'étude des composés gras tels que les huiles (pour les mesures *in vitro*) ou le tissu adipeux humain (pour les mesures *in vivo*). En 2014, Mosconi et al. ont montré que le résultat de la quantification dépendait de la méthode utilisée, ce qui complique la comparaison d'une étude à l'autre. De plus, l'estimation paramétrique par moindres carrés non linéaires appliquée aux spectres RMN des lipides peut conduire, selon la fonction modèle utilisée, à un problème non linéaire mal posé. Les chaînes de triglycéride, qui sont les principaux constituants du tissu adipeux conduisant au signal RMN des lipides, contiennent différents groupements de protons résonnant à des fréquences différentes. Le signal lipidique est donc riche et complexe à modéliser. De nombreuses équipes de recherche ont alors enrichi leur modèle en ajoutant de nombreux paramètres afin de réduire au maximum le résidu (différence entre la courbe réelle et la courbe estimée au carré). Ceci a pour conséquence de rendre les modèles de plus en plus instables et de créer une grande source de variabilité dans les résultats. Fondé sur des travaux en spectroscopie (Hamilton, Yokoo, et al. 2011) qui ont proposé de nouvelles définitions des paramètres liés à la structure d'une chaîne de triglycéride, l'imagerie quantitative (Peterson et Månsson 2013; Benjamin Leporq et al. 2014) a montré des résultats prometteurs tout en utilisant un modèle simplifié. Nous avons adapté ce modèle à l'étude du signal de spectroscopie avec différentes stratégies et implémentations (sous-échantillonnage du signal, prise en compte des temps de relaxation, contraintes liant les paramètres entre eux). Le but étant d'explorer une nouvelle stratégie pour traiter les spectres RMN des lipides issus de tissu adipeux humain acquis à 3T.

Dans le troisième chapitre, nous comparons différentes méthodes (IRM, SRM, DEXA, GC) pour l'étude des tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux dans le contexte de l'étude de surnutrition « Poly-Nut ». Cette étude est promue par les Hospices Civils de Lyon (HCL) dont l'investigatrice principale est Martine Laville du Centre de Recherche en Nutrition Humaine du Rhône-Alpes (CRNH-RA). Le protocole consiste à faire consommer à des hommes volontaires sains pendant un mois 50% des besoins énergétiques journaliers en supplément de leur alimentation habituelle et sans activité physique supplémentaire (le régime se compose de chips, sodas, pains au chocolat et barres chocolatées). La surnutrition est ici riche en graisse et en sucre. De plus, chaque sujet a reçu de manière aléatoire soit des gélules placebo (lactose), soit des gélules de polyphénols. Le but de l'étude est de montrer qu'avec les méthodes SRM et IRM, nous sommes capables de suivre le contenu lipidique du foie mais aussi le volume et la composition en acide gras des tissus adipeux. Cette étude s'appuie sur des contre-mesures telles que la DEXA pour les volumes des TA et la GC pour la composition en acide gras du tissu adipeux sous-cutané. Elle permet plus spécifiquement de déterminer si la méthode IRM fondée sur une unique séquence multi-écho de gradient permet d'avoir accès à tous ces paramètres de manière fiable. En plus de la validation des mesures effectuées par IRM et SRM, nous cherchons à observer des différences entre le groupe ayant reçu des placebos et celui ayant eu une supplémentation en polyphénol.

Enfin, le dernier chapitre aborde les développements expérimentaux qui ont été menés en parallèle de l'étude clinique sur un imageur préclinique à 4,7T ; notamment la possibilité d'estimer, par SRM, la proportion d'oméga-3. Ces derniers possèdent une double liaison sur le troisième carbone de la chaîne d'acide gras, ce qui modifie le déplacement chimique auquel résonne habituellement le groupement de CH<sub>3</sub> permettant alors de les distinguer des autres chaînes. Cependant, cette différence est subtile ce qui implique que pour de faible quantité d'oméga-3 la résonance de CH<sub>3</sub> se retrouve confondue avec les résonances avoisinantes. En 2009, Lundbom et al. ont montré que cette résonance était observable avec une séquence de spectroscopie et à un temps d'écho (TE) long. Cependant, la valeur quantitative reportée est extraite à partir d'un unique TE. Ici l'objectif est d'utiliser plusieurs TE pour corriger l'effet de la relaxation longitudinale et de quantifier les proportions classiques (SFA, MUFA, PUFA) ainsi que les oméga-3. Par la suite, une séquence de J édition en spectroscopie a été exploitée pour essayer de rehausser le signal des oméga-3 à TE court et s'affranchir de l'utilisation de multi-TE qui est chronophage pour une étude in vivo. Enfin, si nous avons utilisé dans le troisième chapitre l'IRM associé à un traitement dédié pour avoir accès à la composition du tissu adipeux, nous pouvons imaginer une stratégie d'acquisition d'imagerie qui contiendrait

une information spectroscopique plus large (imagerie spectroscopique). Des travaux ont été menés dans l'optique de trouver un bon compromis entre résolution spatiale et résolution spectroscopique pour accéder à la proportion d'omégas-3.

# Chapitre 1

## Contexte clinique et scientifique

### Sommaire

---

1.1.	Mécanisme de stockage des graisses dans l'organisme.....	6
1.1.1.	Tissus adipeux blancs.....	6
1.1.2.	Rôle de l'alimentation dans le stockage des graisses.....	11
1.2.	Spectroscopie, imagerie et imagerie spectroscopique.....	12
1.2.1.	Principe physique de la résonance magnétique nucléaire.....	12
1.2.2.	Propriétés magnétiques de la graisse.....	17
1.2.3.	Spectroscopie localisée.....	19
1.2.4.	Imagerie.....	24
1.2.5.	Imagerie spectroscopique.....	28
1.3.	Les différents aspects de la quantification lipidique.....	30
1.3.1.	Mesures volumétriques et anthropométriques.....	31
1.3.2.	Taux de graisse.....	34
1.3.3.	Proportions d'acide gras.....	36
	Conclusion.....	42

---

Au cours de ce premier chapitre introductif, nous décrivons le fonctionnement du stockage des graisses dans l'organisme, notamment le rôle du tissu adipeux et du foie. Par la suite, nous énoncerons quelques notions de base de la physique de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en détaillant les techniques de spectroscopie localisée, d'imagerie et d'imagerie spectroscopique utilisées durant ce travail de thèse pour la quantification lipidique et nécessaires à la compréhension de ce manuscrit.

## **1.1. Mécanisme de stockage des graisses dans l'organisme**

De nombreuses publications traitent du mécanisme du stockage des graisses dans l'organisme et décrivent avec plus de détails (Alligier, Seyssel, et al. 2013) les points synthétisés suivant.

### **1.1.1. Tissus adipeux blancs**

Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme un simple tissu de stockage des lipides. Dans les dernières décennies, de nombreuses études ont montré sa capacité à sécréter des hormones, aussi appelées adipokines, indispensables à l'équilibre énergétique (Kershaw et Flier 2004; Ronti, Lupattelli, et Mannarino 2006), il se révèle alors être un véritable organe endocrine. De plus, ce tissu est très adaptable et peut ainsi se remodeler et s'étendre au cours de la prise de poids (Sethi et Vidal-Puig 2007). Néanmoins, sans que l'on n'en connaisse encore clairement les causes, les modifications morphologiques et fonctionnelles du tissu adipeux au cours de la prise de poids, semblent être responsables de l'apparition des anomalies métaboliques associées à l'obésité, notamment le syndrome métabolique.

A l'échelle du corps entier, il existe deux types de tissu adipeux bien différents : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Ce dernier doit sa couleur brune à une importante quantité de mitochondries présente dans la cellule grasseuse, leur permettant d'assurer leur fonction oxydative, notamment responsable de la thermogénèse. Nous ne nous attarderons pas plus sur ce tissu car il ne fait pas l'objet de l'étude de cette thèse cependant il est nécessaire de mentionner que de plus en plus d'études s'intéressent à son fonctionnement notamment par le biais de l'IRM (Lunati et al. 1999; Houchun H. Hu et al. 2012). Pour en revenir plus particulièrement au tissu adipeux blanc, ce dernier représente en moyenne 15 à 20 % de la masse corporelle chez l'homme et 20 à 25 % chez la femme. Ce tissu représente la plus

grande réserve énergétique de l'organisme. Il est capable de stocker les lipides (phase de ré-estérification) en période postprandiale<sup>1</sup> et de les restituer selon les besoins durant les périodes inter-prandiales (phase de lipolyse<sup>2</sup>). Il s'agit donc d'un organe essentiel dans le maintien de l'homéostasie énergétique et qui est soumis à une très fine régulation à la fois hormonale et nutritionnelle.

#### **1.1.1.1. Les différents dépôts**

Il existe différents dépôts de tissu adipeux blanc dans l'organisme qui ne sont pas équivalents en termes de dimension et de fonction : le tissu adipeux sous-cutané, le tissu adipeux viscéral, le tissu adipeux de soutien et le tissu adipeux de la moelle osseuse. Seuls les dépôts sous-cutanés et viscéraux participent notablement au métabolisme énergétique et seront développés et étudiés dans la suite de ce manuscrit.

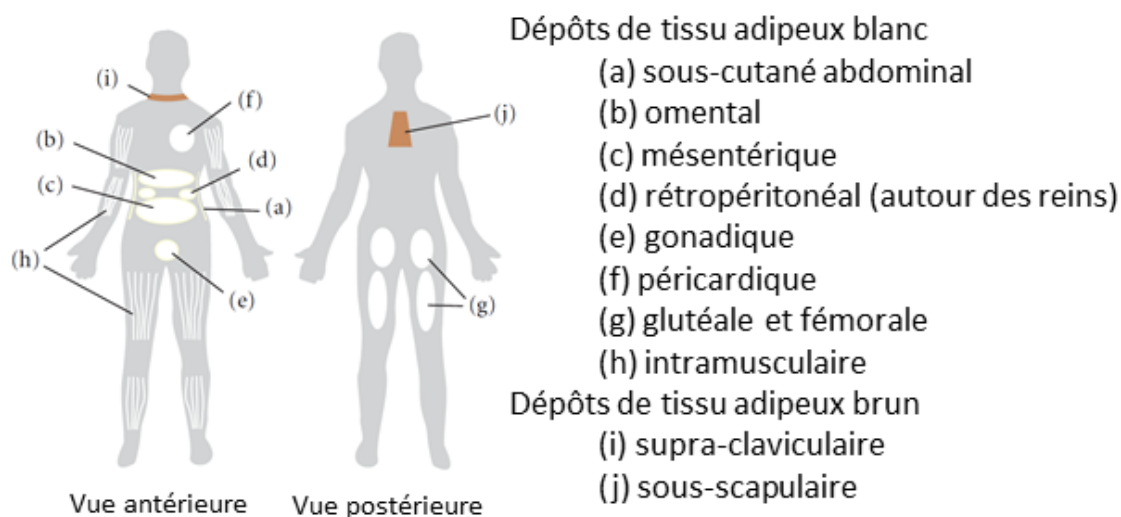
Le *tissu adipeux sous-cutané* est le dépôt principal des lipides de l'organisme, 80% d'entre eux y sont stockés (Wajchenberg 2000). Il est délimité par l'épiderme et l'aponévrose musculaire au niveau de l'organisme entier. Il participe aux fonctions d'isolation thermique et d'amortissement des chocs. La répartition de cette couche de graisse dépend de l'âge et du sexe de l'individu. Notamment, les femmes ont plutôt une accumulation de type gynoïde avec un stockage au niveau de la région glutéale, contrairement aux hommes qui ont une accumulation de type androïde, c'est-à-dire au niveau de l'abdomen.

Le *tissu adipeux viscéral* quant à lui entoure les viscères de l'abdomen, on le retrouve seulement au niveau thoraco-abdominal. Il représente 10-20 % de la graisse totale chez l'homme sain et 5-8 % chez les femmes (Wajchenberg 2000). Il existe différents dépôts de tissu adipeux viscéral chez l'Homme (Bjørndal et al. 2011) : épiploïque, mésentérique, rétropéritonéal (péri-rénal), gonadique et péricardique (figure 1.1).

---

<sup>1</sup> Qui concerne le moment qui suit le repas, qui se produit après le repas.

<sup>2</sup> Processus par lequel l'organisme détruit les lipides en acides gras et en alcool lors de la digestion.



**Figure 1.1 : Les principaux dépôts des tissus adipeux blancs et bruns. Modifiée à partir de (Bjørndal et al. 2011).**

### 1.1.1.2. Répartition du tissu adipeux blanc et ses conséquences métaboliques

L'accumulation de lipides dans les différents dépôts de tissu adipeux n'a pas les mêmes répercussions sur l'organisme. En effet, on distingue l'accumulation excessive de graisse dans la partie haute du corps (principalement les dépôts de tissu adipeux sous-cutané et viscéral au niveau abdominal), de celle dans la partie basse du corps (dépôts de graisse sous-cutanée au niveau des cuisses et de la région glutéale).

Lorsque l'on considère le tissu adipeux de la partie supérieure du corps, c'est préférentiellement l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral qui serait délétère pour la santé, associée aux complications métaboliques et cardiovasculaires (Després 2006). En effet, à adiposité égale, les individus ayant plus de tissu adipeux viscéral montrent des complications métaboliques plus sévères que les individus à obésité dite « sous-cutanée » (Pouliot et al. 1992).

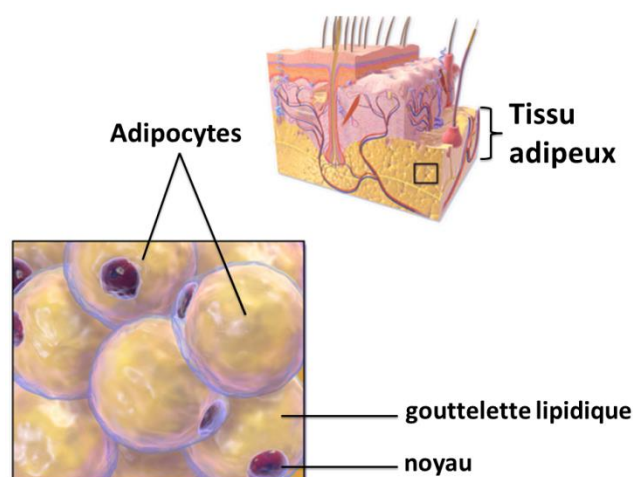
La taille et le nombre des cellules ainsi que l'expression de leurs gènes semblent varier en fonction du type de dépôt mais aussi en fonction de facteurs physiologiques (âge, sexe, corpulence, activité physique, alimentation) ou pathologiques (diabète, obésité) (Wajchenberg 2000). Ceci rend donc difficile voire impossible l'extrapolation des données d'un dépôt à l'organisme entier.



### 1.1.1.3. Composition du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est organisé en lobules d'une taille moyenne de 5 mm, au cœur duquel se trouvent les adipocytes. Les lobules sont entourés par du tissu conjonctif relativement dense qui supporte les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les terminaisons nerveuses. Les cellules du tissu adipeux se composent d'adipocytes, dont la fonction principale est de stocker les lipides, mais également d'autres types cellulaires regroupés sous le terme de cellules de la fraction du stroma vasculaire (SVF). Ces dernières sont largement impliquées dans l'activité sécrétoire du tissu adipeux (80% des sécrétions du tissu adipeux) (Sethi et Vidal-Puig 2007).

L'adipocyte est une cellule sphérique pouvant atteindre 100 à 200  $\mu\text{m}$ , il contient au niveau de son cytoplasme une volumineuse gouttelette lipidique en position centrale, et son noyau est repoussé contre la membrane plasmique (figure 1.2).



**Figure 1.2 :** Coupe schématisée de peau, tissu adipeux et représentation d'adipocytes. <http://drgauthier-nutrition-obesite.fr/quest-ce-quun-adipocyte/>

Les adipocytes assurent le rôle de synthèse et d'hydrolyse des triglycérides, et ils présentent également une fonction sécrétoire avec la libération de plusieurs adipokines. La gouttelette lipidique qui contient principalement des triglycérides, a une taille qui peut aller de 30 à 150  $\mu\text{m}$  selon sa teneur en lipide. La couche externe de cette gouttelette est composée de phospholipides et de cholestérol dans laquelle sont aussi enchâssées de multiples protéines. Cependant, la molécule de triglycéride est le principal contributeur au signal RMN (Hakumäki et Kauppinen 2000).

#### **1.1.1.4. Synthèse des triglycérides**

Il existe deux voies de synthèse des triglycérides au sein de l'adipocyte, la ré-estérification des acides gras issus de la lipolyse intravasculaire et la lipogenèse de novo.

##### Ré-estérification

Au cours de la ré-estérification, trois acides gras sont condensés sur un glycérol-3-phosphate par estérification successive pour donner un triglycéride (Large et al. 2004). Avant l'étape d'estérification, les acides gras (activés en acyl-CoA) présents peuvent subir des étapes d'élongation et de désaturation au niveau du réticulum endoplasmique, permettant de réduire leur rigidité et ainsi améliorer leur stockage. Ces étapes sont assurées par des enzymes spécifiques telles que des désaturases (SCD1 (stéaroyl-coa désaturase 1) et des élongases (ELOVL (elongation of very long chain) (Jakobsson, Westerberg, et Jacobsson 2006).

##### Lipogenèse de novo

La lipogenèse de novo est une autre voie de synthèse des triglycérides à partir de précurseurs non lipidiques, principalement le glucose. Dans l'espèce humaine, la lipogenèse est majoritairement hépatique. Néanmoins, la lipogenèse hépatique reste mineure comme source d'apport de triglycérides chez l'homme par rapport à la source alimentaire. Cette lipogenèse *de novo* serait stimulée dans des conditions où les apports énergétiques sont très importants, principalement sous forme de glucide ou de fructose (Minehira et al. 2003; Acheson et al. 1988).

#### **1.1.1.5. Régulation de la synthèse des triglycérides et de la lipogenèse**

Les voies de synthèse des triglycérides sont soumises à un contrôle nutritionnel mais également pluri-hormonal. L'insuline et le glucose induisent les enzymes de la lipogenèse et de la ré-estérification des acides gras, alors que le glucagon et les acides gras polyinsaturés les inhibent (Osborne 2000).

#### **1.1.1.6. Syndrome métabolique**

Le syndrome métabolique désigne l'association d'anomalies cliniques et biologiques pouvant accroître le risque de développer des maladies liées au métabolisme comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou encore les stéatoses hépatiques non-alcooliques. Cette dernière décennie, plusieurs critères ont été définis et placent l'adiposité abdominale et la résistance à l'insuline au centre de ce syndrome métabolique. L'EGIR (« European Group for the Study of Insulin Resistance ») caractérise l'obésité

centrale notamment par une circonférence au niveau de la taille supérieure à 94 cm pour les hommes et supérieure à 80 cm pour les femmes, par un taux de triglycéride dans le sang supérieur à 2,0 mmol/L ou un taux de cholestérol HDL inférieur à 1, par de l'hypertension (>140/90 mm Hg) et par une glycémie à jeun supérieur à 6,1 mmol/L (Balkau et Charles 1999).

## 1.1.2. Rôle de l'alimentation dans le stockage des graisses

### *Balance énergétique positive*

Une *Balance énergétique positive* est provoquée par un excès de calories dû à un déséquilibre entre les calories apportées par l'alimentation et les calories dépensées par l'organisme. Si cet excès calorique est prolongé, l'organisme va le stocker et induire une prise de poids. La dépense énergétique totale est composée : du *métabolisme de base* correspond à l'énergie minimale dont le corps a besoin pour maintenir ses fonctions vitales ; de la *thermogénèse postprandiale* qui correspond à l'énergie dépensée par l'organisme pour digérer, transporter, métaboliser et stocker l'énergie provenant des aliments ; de la *thermorégulation* qui correspond à l'énergie produite pour réguler la température corporelle et enfin de *l'activité physique* dépendante de l'activité musculaire. Une balance énergétique positive est alors responsable de la prise de poids pouvant conduire à un stade de surpoids ou d'obésité.

### *Effets des polyphénols sur le métabolisme du tissu adipeux*

Sur la base de la compréhension actuelle de la physiopathologie de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, de multiples interventions pharmacologiques et non pharmacologiques ont été développées dans le but d'améliorer le contrôle glycémique et la prévention des complications du diabète. Dans ce domaine, l'utilisation d'aliments fonctionnels et de leurs composants bioactifs a récemment été considérée comme une nouvelle approche dans la prévention et la prise en charge du diabète et de ses complications (review de (Bahadoran, Mirmiran, et Azizi 2013)). Les polyphénols sont des composés phytochimiques naturels présents dans les aliments à base de végétaux, tels que les fruits, les légumes, les graines entières, les céréales, les légumineuses, le thé, le café, le vin et le cacao; plus de 8000 composés polyphénoliques, y compris les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les lignanes polymériques ont été identifiés dans les aliments végétaux (Pandey et Rizvi 2009). L'efficacité potentielle des polyphénols sur le métabolisme des glucides et sur l'homéostasie du glucose a été bien étudiée *in vitro*, sur des modèles

animaux et dans certains essais cliniques (review de (Hanhineva et al. 2010; Anhê et al. 2013)) et a montré l'atténuation des réponses glycémiques postprandiales et de l'hyperglycémie à jeun, mais aussi l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Des études cliniques avec des régimes bien définis, comme menées dans cette thèse, sont nécessaires pour confirmer les implications de la consommation de polyphénols pour la prévention du syndrome métabolique. Cependant, des outils non invasifs permettant de suivre des changements métaboliques sont indispensables ; notamment dans la suite de ce manuscrit, nous verrons que l'imagerie et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, associées à des stratégies d'acquisition et de traitement du signal adaptées, permettent de suivre des modifications de l'adiposité abdominale.

## 1.2. Spectroscopie, imagerie et imagerie spectroscopique

Les techniques de Spectroscopie et d'Imagerie par Résonance Magnétique (SRM et IRM) sont fondées sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) reposant sur les propriétés de certains noyaux. Ces propriétés, plus particulièrement celle du proton  $^1\text{H}$ , seront décrites brièvement dans une première section. Les sections suivantes détailleront la spectroscopie localisée, l'imagerie et l'imagerie spectroscopique utilisées dans la suite du manuscrit.

### 1.2.1. Principe physique de la résonance magnétique nucléaire

#### Le spin nucléaire

Le phénomène de RMN a son origine dans les propriétés magnétiques des noyaux. Certains noyaux ont un moment angulaire  $S$  (ou encore moment cinétique ou communément appelé « spin ») auquel est associé un moment magnétique  $\mu$  permettant de décrire le couple  $\Gamma$  s'exerçant sur un objet placé dans un champ magnétique  $B$  par  $\Gamma = \mu \times B$  (en  $\text{J.T}^{-1}$ ).

Le rapport gyromagnétique  $\gamma$ , qui est propre à chaque noyau, lie le moment angulaire et le moment magnétique par :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S} \quad (1.1)$$

La norme du vecteur  $S$  est défini par :

$$\|\vec{S}\| = \hbar\sqrt{s(s+1)} \quad (1.2)$$

Où  $\hbar$  est la constante de Planck divisée par  $2\pi$  et  $s$  le nombre de spin.

Les noyaux des atomes sont constitués de neutrons et de protons et on nomme par convention :  $A$  le nombre de masse (nombre de neutrons et de protons) et  $Z$  le nombre de charges (nombre de protons). Si  $A$  est pair et  $Z$  pair alors  $s = 0$ , il n'y a alors pas de moment angulaire ni de moment magnétique et par conséquent aucun phénomène de RMN ne peut se produire (exemple :  $^{12}\text{C}$ ). A contrario dans les deux cas suivants, un phénomène RMN est observable si  $A$  est pair et  $Z$  impair ( $s \neq 0$  et entier) et si  $A$  est impair ( $s$  est demi-entier). Parmi les principaux noyaux d'intérêt biologique possédant des propriétés magnétiques, seul le proton (ou noyau d'hydrogène  $^1\text{H}$ ) sera étudié dans ce travail. Il présente un intérêt particulier pour la quantification des graisses dans l'organisme grâce à sa présence dans la molécule d'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et dans les chaînes de triglycéride (voir section 1.2.2 « Propriétés magnétiques de la graisse »). Dans le cadre de la quantification lipidique, le  $^{13}\text{C}$  peut aussi être un noyau d'intérêt. Certaines études ont montré que son abondance naturelle, bien que très faible, était suffisante pour réaliser une quantification lipidique (Zancanaro et al. 1994).

### Aimantation en présence d'un champ magnétique $B_0$

En l'absence d'un champ magnétique externe, les moments magnétiques  $\mu$  des protons d'un échantillon tissulaire sont orientés dans des directions aléatoires, l'aimantation macroscopique résultante est nulle. Soumis à un champ magnétique extérieur  $\mathbf{B}_0$ , les moments magnétiques s'orientent préférentiellement selon la direction de  $\mathbf{B}_0$ . La somme des aimantations élémentaires n'est alors plus nulle et il apparaît une aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$  orientée suivant  $\mathbf{B}_0$ . Les moments magnétiques qui ne sont pas parfaitement alignés avec  $\mathbf{B}_0$ , sont soumis à un phénomène de précession autour de l'axe  $\mathbf{B}_0$  à une fréquence angulaire :

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (1.3)$$

On appelle communément la fréquence de Larmor  $\nu_0$  la fréquence angulaire  $\omega_0$  normalisée par  $2\pi$ . Supposons que le champ  $\mathbf{B}_0$  soit orienté selon l'axe Oz dans un repère cartésien. La projection de l'aimantation cinétique  $S_z$  a  $2s+1$  directions possibles ( $s$  étant le nombre de spins). Dans le cas du proton  $^1\text{H}$ , qui possède un nombre de spin de  $1/2$ , on aura 2 orientations possibles : le sens parallèle (dans le même sens que  $\mathbf{B}_0$ ) et antiparallèle (opposé de  $\mathbf{B}_0$ ). Ces deux angles de précession correspondent à deux états d'énergie : basse énergie  $E_1$  dans le cas parallèle et haute énergie  $E_2$  dans le cas antiparallèle.

$$E_p = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (1.4)$$

En projetant sur l'axe Oz et en utilisant la relation (1.1), l'équation (1.4) devient :

$$E_p = -\gamma S_z \cdot B_0 \quad (1.5)$$

En combinant les relations (1.2) et (1.5), on en déduit  $E_1$  et  $E_2$  :

$$\begin{aligned} E_1 &= -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 = -\frac{1}{2} \hbar \omega_0 \\ E_2 &= +\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 = +\frac{1}{2} \hbar \omega_0 \end{aligned} \quad (1.6)$$

A l'équilibre, l'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$  est alignée suivant  $\mathbf{B}_0$  selon z, sans composante transversale dans le plan xOy perpendiculaire à Oz. En effet, les protons s'alignent selon  $\mathbf{B}_0$ , précessant autour de  $\mathbf{B}_0$  avec un angle donné : ce qui fait apparaître une composante longitudinale  $M_z$ . De plus, il y a une « dispersion » des composantes transversales élémentaires dans différentes directions (on dit que les protons sont déphasés) : il n'y a donc pas de composante transversale  $M_{xy}$  résultante. Il n'est pas possible de mesurer directement le vecteur d'aimantation macroscopique à l'équilibre (selon Oz), car il est « infiniment petit » par rapport à  $\mathbf{B}_0$ . Pour pouvoir le mesurer, il faut le basculer dans le plan xOy par un deuxième champ magnétique (ou onde de radiofréquence).

### Déplacement chimique

La fréquence angulaire ne dépend pas seulement du rapport gyromagnétique et de  $\mathbf{B}_0$  mais aussi de l'environnement chimique du noyau étudié. Notamment l'environnement électronique est associé à la notion d'écrantage (et la constante d'écrantage  $\sigma$ ) qui induit une faible variation de  $\mathbf{B}_0$  localement. Le moment magnétique induit par l'environnement électronique s'oppose au champ  $\mathbf{B}_0$ . Le champ magnétique effectif  $\mathbf{B}_{eff}$  s'exprime alors :

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma) \quad (1.7)$$

La fréquence de résonance devient alors :

$$\nu = \left( \frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0(1 - \sigma) \quad (1.8)$$

Cette fréquence est conventionnellement normalisée par une fréquence de référence  $\nu_{ref}$ , par exemple celle du tétraméthylsilane (TMS), afin d'être indépendante du champ  $\mathbf{B}_0$ . Le déplacement chimique exprimé en ppm (parti par million) est le plus souvent employé :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad (1.9)$$

Cette notion de déplacement chimique est particulièrement utile dans le cas de l'étude de la graisse notamment pour différencier l'eau de la graisse dans un premier temps, puis pour pouvoir distinguer les graisses polyinsaturées, mono-insaturées et saturées dans un second temps (voir paragraphe Propriétés magnétiques de la graisse).

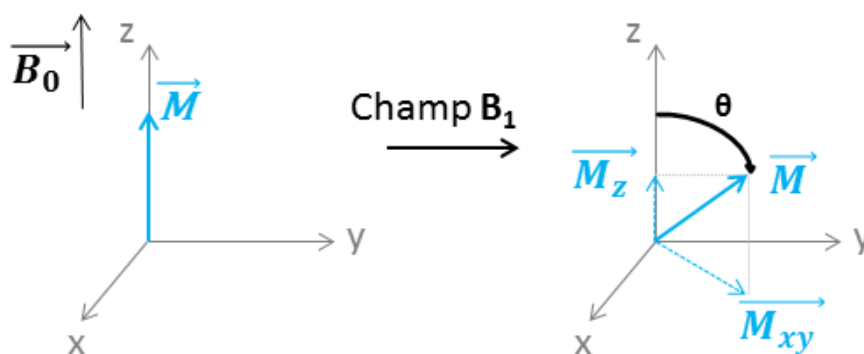
### Perturbation de l'équilibre par une impulsion radiofréquence

En appliquant un deuxième champ magnétique  $\mathbf{B}_1$  appliqué communément dans le plan transverse xOy, l'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$ , tout en continuant à précesser autour de  $\mathbf{B}_0$  (Oz) à la fréquence angulaire  $\omega_0$ , va se mettre également à précesser autour de  $\mathbf{B}_1$  (dans le plan xOy) à la fréquence angulaire  $\omega_1$ .

$$\omega_1 = \gamma B_1 \quad (1.10)$$

On parle aussi du basculement de l'aimantation. Le champ  $\mathbf{B}_1$  est appliqué durant une courte durée par l'intermédiaire d'une *impulsion RF* correspondant à une phase dite *d'excitation*. On peut calculer l'angle  $\theta$  de basculement (en rad), il correspond à l'angle entre  $\mathbf{M}$  et  $\mathbf{B}_0$ . Dans le cas où l'amplitude et la phase de  $\mathbf{B}_1$  sont constantes, l'angle  $\theta$  peut s'exprimer en fonction de  $\mathbf{B}_1$ , du rapport gyromagnétique  $\gamma$  et du temps d'application du champ  $\mathbf{B}_1$  :

$$\theta = \gamma B_1 t \quad (1.11)$$



**Figure 1.3 : Représentation du basculement de l'aimantation macroscopique.**

Après l'impulsion RF, l'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$  peut être représentée par deux composantes : l'aimantation longitudinale ( $M_z$ ) et l'aimantation transversale ( $M_{xy}$ ).

### Retour à l'état d'équilibre : phénomène de relaxation et équation de Bloch

Après le processus d'excitation du système de spins, l'aimantation macroscopique  $\mathbf{M}$  va revenir à l'état d'équilibre thermique en libérant l'énergie, que le système de spins a absorbée lors de l'action de  $\mathbf{B}_1$  dans son environnement. On observe deux types d'échange d'énergie : les interactions spin-spin (associées au temps de relaxation  $T_2$ ) et les interactions spin-réseau (associées au temps de relaxation  $T_1$ ). Ces transitions spin-réseau reflètent l'échange d'énergie entre le système de spins et l'environnement qui constitue un réservoir d'énergie. Dans la matière condensée (liquide et solide) les interactions entre spins situés sur les différentes molécules sont une source d'échange d'énergie entre spins, on parle alors d'interactions spin-spin, ce qui produit une perte progressive de cohérence des spins.

Bloch a décrit l'évolution de l'aimantation  $\mathbf{M}$  suivant les trois dimensions (x,y,z). Supposons encore le champ  $\mathbf{B}_0$  selon l'axe Oz. Les équations de Bloch s'expriment :

$$\begin{cases} \frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} = -\frac{(M_z - M_0)}{T_1} \end{cases} \quad (1.12)$$

Où  $M_0$  est l'aimantation macroscopique à l'état d'équilibre thermique. A partir des équations de Bloch (1.12), on peut décrire le retour de la composante longitudinale par :

$$M_z(t) = M_0 - (M_0 - M_z(0)) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \quad (1.13)$$

Et la décroissance exponentielle de la composante transversale par:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (1.14)$$

Avec  $t$  représentant le temps après la perturbation de l'équilibre thermique.



En pratique, l'inhomogénéité du champ  $\mathbf{B}_0$  accroît la vitesse de décroissance de l'aimantation transverse. Cette inhomogénéité peut être due à l'aimant, mais aussi aux hétérogénéités microscopiques et macroscopiques de l'échantillon. Cette décroissance du signal est alors dépendante du temps de relaxation apparent  $T2^*$  défini par :

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \frac{1}{T2'} \quad (1.15)$$

Où  $T2'$  caractérise le temps de relaxation induit par cette perte de cohérence due aux variations locales du champ magnétique.

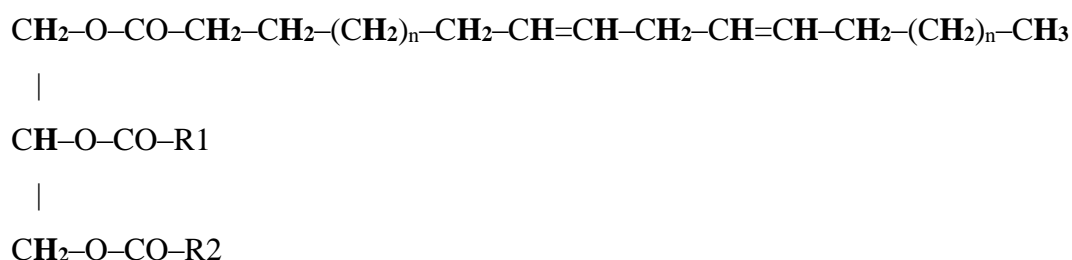
### Couplage scalaire

Le couplage scalaire, noté  $J$  et aussi appelé couplage dipôle-dipôle indirect, est une interaction entre plusieurs spins à travers les liaisons chimiques d'une molécule. C'est une interaction indirecte entre deux spins nucléaires qui provient des interactions hyperfines entre les noyaux et la densité électronique locale et provoque une subdivision des raies de résonances du signal RMN. Les couplages scalaires permettent d'obtenir des informations importantes sur les liaisons entre les atomes qui sont utilisées en RMN de haute résolution pour connaître la structure de la molécule. Cependant, en spectroscopie *in vivo*, la problématique principale est d'identifier les raies de résonances et de les quantifier. En pratique dans le cerveau les couplages scalaires donnent lieu à une signature spectrale bien particulière (Behar et Ogino 1991) mais aussi pour la graisse (Yahya et Fallone 2010).

## 1.2.2. Propriétés magnétiques de la graisse

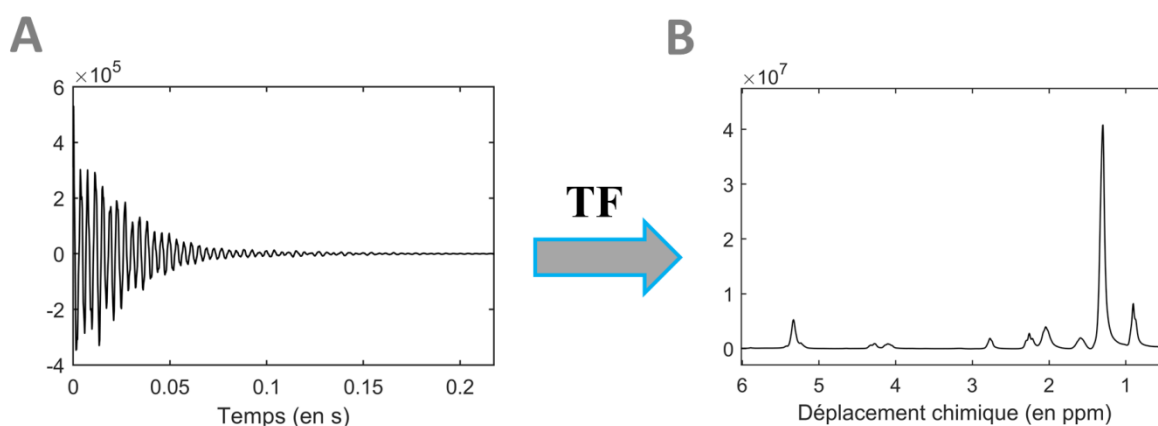
Nous allons, dans ce paragraphe, nous focaliser sur le signal RMN en provenance de la graisse. Ici, nous associons la terminologie de « graisse » à la molécule de triglycéride présente en abondance dans les tissus adipeux. Cette molécule est constituée de trois acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol. Les acides gras sont des chaînes composées essentiellement de carbones et d'hydrogène. La nomenclature des acides gras ( $C_X:YnZ$ ) les différencie selon le nombre de carbones ( $X$ ), le nombre de double liaison ( $Y$ ) et la position de la première double liaison ( $Z$ ). Sur la figure 1.4, est représentée une branche de la chaîne de triglycéride, les deux autres acides gras sont notées  $R1$  et  $R2$  pour signaler leur présence sans les détailler. Les triglycérides, plus précisément leurs acides gras, peuvent être saturés, mono-insaturés ou polyinsaturés. Ces termes désignent la saturation en hydrogène des acides gras (présence ou non de double liaison). La molécule de triglycéride est composée de nombreux

groupements de protons ayant un environnement chimique différent ce qui induit que chacun de ces groupements possède un déplacement chimique spécifique (Tableau 2).



**Figure 1.4 : Chaîne de triglycéride. Une seule branche de la chaîne de triglycéride est représentée, les deux autres acides gras sont notés R1 et R2 pour signaler leur présence sans les détailler.**

Notons que la molécule d'eau (H<sub>2</sub>O) possède, elle aussi, un déplacement chimique qui lui est propre (à 4,7 ppm). Ainsi, si l'on compare une molécule d'eau (H<sub>2</sub>O) et une molécule de triglycéride (figure 1.4), on aura deux signaux différents. La partie réelle du signal temporel typiquement recueilli à partir d'un échantillon d'huile (ici l'huile de sésame) est représentée sur la figure 1.5A ainsi que le spectre après sa transformée de Fourier (TF) sur la figure 1.5B. Le spectre de l'eau sera formé quant à lui d'un seul pic résonnant à 4,7 ppm.



**Figure 1.5 : Signal temporel (A) et de spectroscopie (B) d'un échantillon d'huile de sésame acquis avec une séquence PRESS à 4,7T pour un TE = 15 ms, TR = 5s, 32 accumulations.**

Toute la stratégie de quantification d'imagerie et de spectroscopie réside dans la modélisation de ce signal multi-pics pouvant englober le signal de l'eau et celui de la graisse. Si l'on s'appuie sur la structure de la chaîne de triglycéride (figure 1.4) et au tableau 1.1, on constate que deux pics sont particulièrement intéressants : le pic du groupement diallylique qui est un marqueur des acides gras polyinsaturés (à 2,8 ppm) et le pic du groupement

oléfinique qui permet de quantifier plus globalement l'ensemble des acides gras insaturés (à 5,3 ppm).

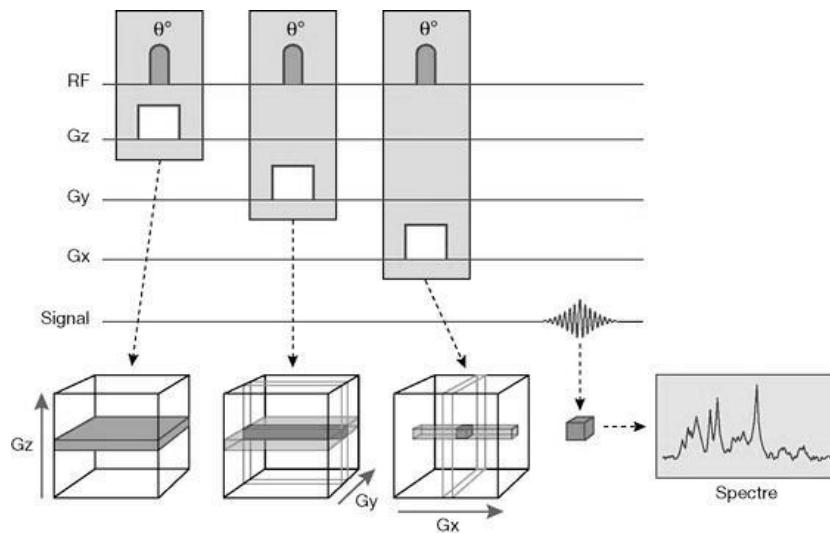
**Tableau 1.1 : Déplacement chimique de chaque groupement chimique présent dans une chaîne de triglycéride.**

Groupement chimique	Dénomination	Déplacement chimique (ppm)
$-CH=CH-$	Oléfinique	5,3
$-CH-COO-$	Glycérol	5,2
$-CH_2-COO-$	Glycérol	4,3
$-CH_2-COO-$	Glycérol	4,2
$-CH=CH-CH_2-CH=CH-$	Diallylique	2,8
$-CH_2-CH_2-CO-$	$\alpha$ -carboxyle	2,23
$-CH=CH-CH_2-CH_2-$	$\alpha$ -oléfinique	2,03
$-CH_2-CH_2-CO-$	$\beta$ -carboxyle	1,6
$-(CH_2)_n-$	méthylène	1,3
$-CH_3-$	méthyle	0,9
$H_2O$	eau	4,7

Le signal de spectroscopie est temporellement échantillonné avec une période permettant d'observer dans le domaine fréquentiel tous les pics indiqués dans le tableau 1.1. La SRM est donc a priori plus adaptée pour avoir une information qualitative de la graisse (polyinsaturée, mono-insaturée et saturée) comme présenté sur la figure 1.5. L'imagerie a une meilleure résolution spatiale permettant de connaître la localisation des organes au détriment de la résolution temporelle (sous-échantillonnage du signal temporel de la figure 1.5 A).

### 1.2.3. Spectroscopie localisée

La sélection spatiale est réalisée à l'aide d'impulsions RF sélectives appliquées séquentiellement en présence de gradients de champ (voir ci-dessous 1.2.3.1) dans les trois directions orthogonales (figure 1.6). La taille du volume sélectionné est ajustée en agissant sur l'intensité du gradient de sélection, et sa position est modifiée en agissant sur la fréquence des impulsions RF. Une fois le volume sélectionné (appelé monovoxel), l'acquisition du signal se fait en l'absence de gradient. Le spectre est alors obtenu après une transformation de Fourier discrète à une dimension du signal acquis.



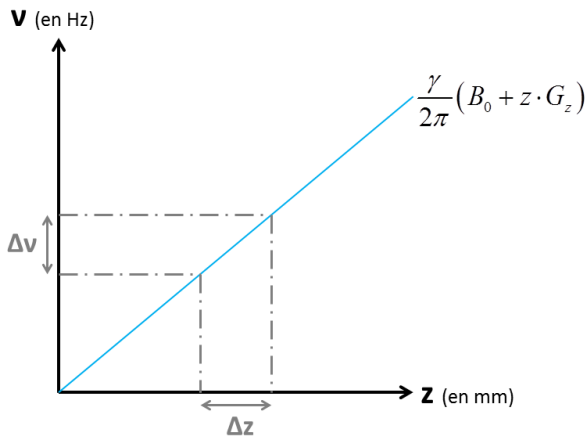
**Figure 1.6 :** Chronogramme générique d'une séquence de spectroscopie localisée pour la sélection d'un volume d'intérêt (VOI). Image extraite de <https://clemedicine.com/16-la-spectrometrie-par-ressonance-magnetique/>.

### 1.2.3.1. Localisation du signal : la sélection de coupe

#### Gradients de champ magnétique et sélection de coupe

Au niveau de l'étude *in vivo*, il est important de pouvoir localiser la provenance du signal, ce qui nous permettra par la suite de faire de la spectroscopie localisée ou de l'imagerie. Les gradients de champ magnétique permettent d'appliquer une variation spatiale du champ magnétique qui sera superposée à  $\mathbf{B}_0$ . Il est alors possible de faire une sélection des aimantations excitées dans un volume d'intérêt en appliquant un gradient durant l'excitation (champ  $\mathbf{B}_1$ ) et dans la direction souhaitée de sélection. L'épaisseur de coupe dépendra alors de la valeur de la bande passante de l'impulsion RF ( $\Delta\nu$ , figure 1.7) ainsi que de l'amplitude du gradient ( $G_z$ , figure 1.7).

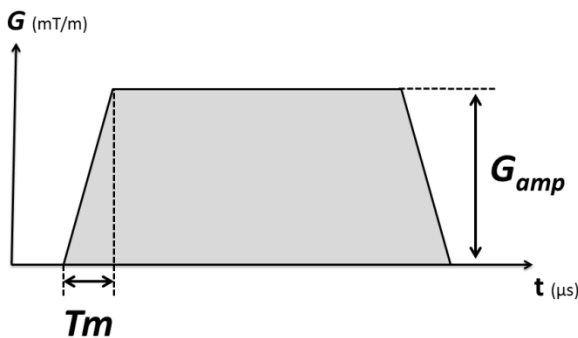
$$\Delta z = \frac{\Delta\nu}{\frac{\gamma}{2\pi} G_z} \quad (1.16)$$



**Figure 1.7 :** Principe de la sélection de coupe dans la direction  $z$ .  $\Delta\nu$  : bande passante,  $\Delta z$  : épaisseur de coupe,  $G_z$  : amplitude du gradient de sélection de coupe,  $\gamma$  : rapport gyromagnétique,  $B_0$  : valeur du champ statique (en T).

Il suffit par la suite de faire varier la fréquence centrale de l'impulsion RF pour sélectionner une position de coupe différente.

### Caractéristiques d'un gradient



**Figure 1.8 :** Caractéristiques d'un gradient

Dans la suite du manuscrit, nous représenterons les gradients dans des chronogrammes sous la forme soit de trapèzoïde soit plus simplement sous la forme de rectangle. Le gradient se caractérise par son amplitude  $G_{amp}$  (en mT/m), le temps de montée  $T_m$  (en  $\mu s$ ) voir la figure 1.8.

Nous pouvons aussi définir la pente de montée du gradient « slew rate » (en mT/m/s ou T/m/ms) définie par le rapport de  $G_{amp}/T_m$ .

### Artéfact de déplacement chimique suivant la coupe

La sélectivité spatiale par la variation de fréquence peut cependant provoquer un artéfact lié au déplacement chimique des différents groupements de protons. En effet, si nous prenons le cas particulier de l'eau et de la graisse, l'eau a un déplacement chimique de 4,7 ppm et le pic principal de la graisse un déplacement chimique de 1,3 ppm. Notons  $\Delta\delta$  la différence de ces deux déplacements chimiques (à 3T cette différence est de 434Hz et à 4,7T de 680Hz). Si la fréquence centrale de l'impulsion RF est réglée sur la fréquence de l'eau, les protons de la graisse excités ne proviendront pas de la même coupe que celle de l'eau comme illustré sur la figure 1.9.

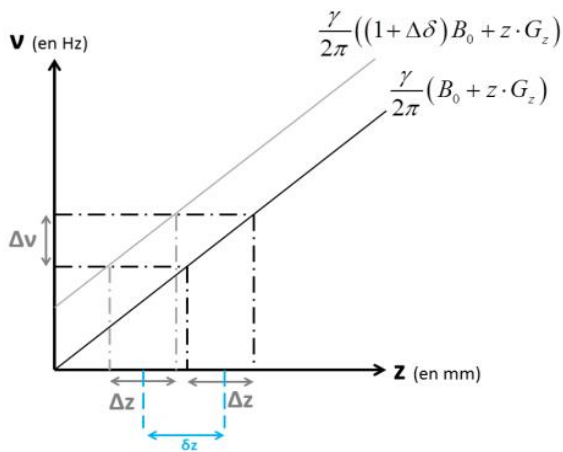


Figure 1.9 : Artéfact de déplacement chimique lors de la sélection de coupe dans la direction  $z$ .  $\Delta\nu$  : bande passante,  $\Delta z$  : épaisseur de coupe,  $G_z$  : amplitude du gradient de sélection de coupe,  $\gamma$  : rapport gyromagnétique,  $B_0$  : valeur du champ statique (en T),  $\Delta\delta$  : écart de déplacement chimique entre les deux résonances (exprimé en ppm),  $\delta z$  : écart du à l'artéfact de déplacement chimique

Ainsi l'écart spatial entre les protons réellement excités et ceux que l'on souhaitait exciter est donné par :

$$\delta z = \Delta\delta \cdot B_0 \cdot \frac{\gamma}{2\pi} \cdot \frac{\Delta z}{\Delta\nu} \quad (1.17)$$

Pour réduire cet écart, il faut donc augmenter la bande passante des RF augmentant l'amplitude du gradient qui est toutefois limitée par ses valeurs physiques **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Les gradients d'encodage de l'image correspondant au plan de coupe sélectionné seront décrits dans le paragraphe 1.2.4. qui traite plus spécifiquement de l'imagerie.

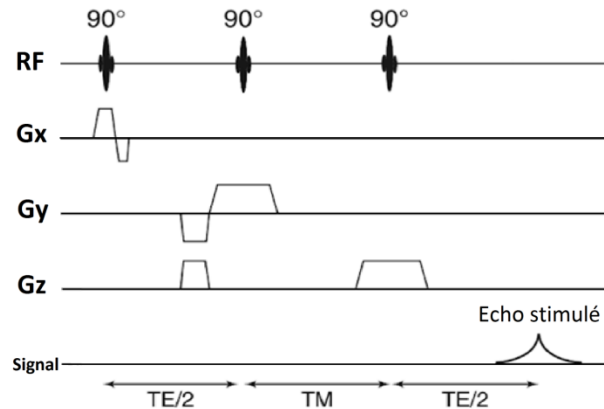
### 1.2.3.2. Séquences de spectroscopie localisée

Plusieurs séquences de spectroscopie localisée ont émergé ces dernières décennies : DRESS (Depth Resolved Surface-coil Spectroscopy), ISIS (Image Selected In vivo Spectroscopy), STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode), PRESS (Point Resolved Spectroscopy), LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing). La séquence DRESS permet de sélectionner une tranche d'intérêt en forme de disque alors que les séquences STEAM, PRESS et ISIS permettent d'avoir un volume cuboïde. La séquence LASER est une récente modification de la séquence PRESS utile lorsque le champ  $B_1$  engendré par la bobine RF est inhomogène. Ici, nous détaillerons uniquement les deux séquences STEAM et PRESS qui sont utilisées par la suite et qui sont disponibles de façon standard sur les IRM cliniques.

#### STEAM

La séquence STEAM (Frahm, Merboldt, et Hänicke 1987) comporte trois impulsions sélectives de  $90^\circ$  appliquées aux instants 0,  $TE/2$ ,  $TE/2+TM$ ,  $TM$  étant le temps de mixage

(figure 1.10). En 1950, Hahn décrit cette séquence en spécifiant qu'elle génère cinq échos et trois FID. En plus de ces gradients de sélection de coupe, nous distinguons les gradients de dispersion qui ont pour but d'éliminer tous les échos à l'exception de l'écho stimulé, mais aussi d'assurer la dispersion des aimantations avant la seconde impulsion (figure 1.10).



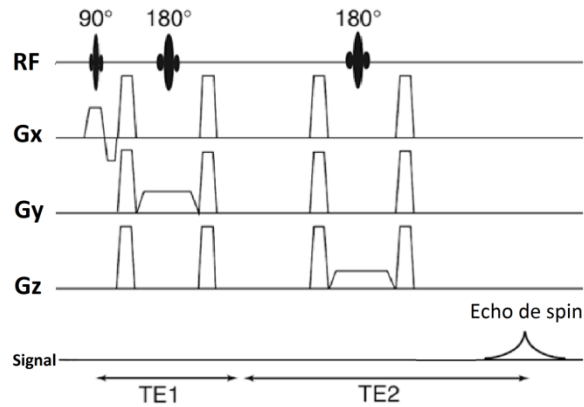
**Figure 1.4 : Chronogramme de la séquence STEAM. Illustration modifiée à partir de (Bottomley et Griffiths 2016) p 112**

La première impulsion, appliquée en présence de gradient  $G_x$ , place dans le plan  $xOy$  les aimantations situées dans une coupe perpendiculaire à la direction  $X$ . La seconde impulsion, appliquée en présence du gradient  $G_y$ , va basculer les aimantations d'une coupe orthogonale à l'axe  $Y$ , et replacer le long de l'axe  $Z$  les composantes  $M_y$  des aimantations situées dans la barre constituant l'intersection des deux coupes. Un temps  $TE/2$  sépare ces deux impulsions. L'aimantation reste le long de l'axe  $Z$  pendant le temps  $TM$  qui doit rester court par rapport au temps de relaxation  $T_1$ , mais qui peut être long devant  $T_2$  ou  $T_2^*$ . La dernière impulsion, appliquée en présence de gradient  $G_z$ , va basculer une nouvelle fois les aimantations d'une coupe orthogonale à  $Z$ , replace dans le plan transversal l'aimantation de cette coupe.

La séquence STEAM permet de conserver seulement la moitié de l'amplitude du signal obtenu par la séquence PRESS mais permet d'utiliser des temps  $TE$  plus courts.

### PRESS

Tout comme la séquence STEAM, la séquence PRESS (Bottomley 1987) comporte trois impulsions sélectives. Seule la première impulsion est de  $90^\circ$ , les deux suivantes sont de  $180^\circ$  à un temps  $TE_1/2$  et  $TE_1 + TE_2/2$  pour re-phaser les aimantations. La première impulsion de  $180^\circ$  permet de créer un écho de spin à  $TE_1$  et la deuxième de refocaliser cet écho à  $TE_2$ . L'écho de spin final se trouve à  $TE = TE_1 + TE_2$ .



**Figure 1.5 : Chronogramme de la séquence PRESS. Illustration modifiée à partir de (Bottomley et Griffiths 2016) p 111**

La séquence PRESS est très utilisée en spectroscopie localisée du proton. Elle présente l'avantage d'avoir une meilleure sensibilité que la séquence STEAM. Cependant, dans le contexte de l'étude du signal lipidique, certaines raies de résonance peuvent apparaître avec une amplitude négative ou disparaître à certains TE. Ce phénomène n'est pas observé pour la séquence STEAM aux mêmes TE (Hamilton et al. 2009).

## 1.2.4. Imagerie

A présent que nous avons abordé les fondements de la résonance magnétique nucléaire, nous allons nous intéresser brièvement à la construction d'une image.

### 1.2.4.1. Formation d'une image RMN

Tout comme pour le cas de la sélection de coupe (1.2.3.1), les gradients de champ magnétique peuvent être utilisés pour créer une variation spatiale de la fréquence de résonance des aimantations afin de permettre la localisation du signal. L'acquisition d'une image 2D consiste alors à acquérir les fréquences spatiales de l'image par mesure dans un plan de Fourier (aussi appelé *espace k*). Le signal recueilli peut s'exprimer ainsi :

$$S(k_x, k_y) = \iint \rho(x, y) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (1.18)$$

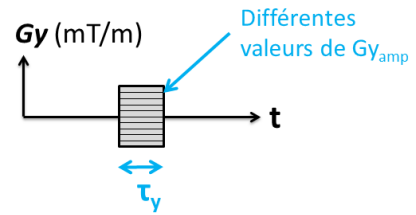
Nous distinguons deux codages : le codage spatial de phase et celui de lecture.

Nous prendrons ici comme exemple le cas où les gradients sont constants sur leur durée d'application.



### Type d'encodage dans l'espace k

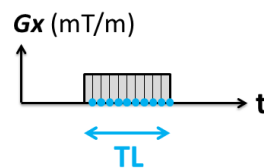
Le *codage spatial de phase* consiste à appliquer un gradient (par exemple  $G_y$ ) durant un temps ( $\tau_y$ ) qui va créer une différence de fréquence selon l'axe  $Oy$  durant sa durée d'application. Les aimantations qui vont tourner plus vite que les autres vont acquérir une phase plus importante, la phase acquise étant proportionnelle à la position sur l'axe  $y$ .



**Figure 1.6 : Schéma du gradient de phase**

A l'arrêt du gradient, les aimantations vont précesser à leur fréquence initiale  $\nu_0$  (en absence d'inhomogénéités), tout en conservant le déphasage acquis.

Le *codage spatial de lecture* consiste à échantillonner le signal en même temps que l'application du gradient.



**Figure 1.7 : Schéma du gradient de lecture. TL : temps de lecture**

Les paramètres  $k_x$  et  $k_y$  sont proportionnels à l'aire sous la courbe de l'amplitude du gradient en fonction du temps :

$$k(\tau) = \gamma \int_0^{\tau} G(t) dt \quad (1.19)$$

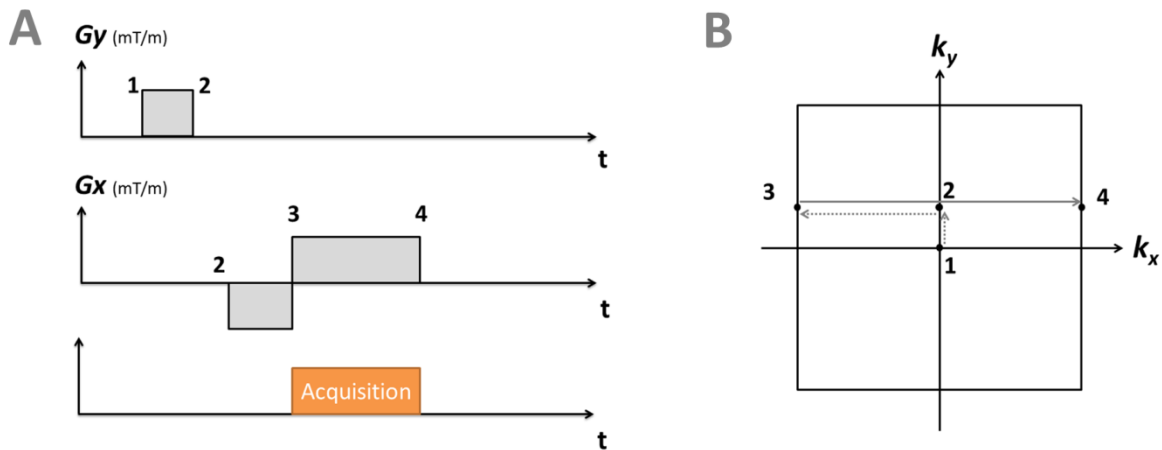
Lorsque les gradients  $G_y$  et  $G_x$  sont constants au cours du temps, l'équation (1.19) s'écrit pour  $k_x$  et  $k_y$  :

$$\begin{cases} k_y = \gamma \times G_{y_{amp}} \times \tau_y \\ k_x = \gamma \times G_{x_{amp}} \times t \end{cases} \quad (1.20)$$

Où  $G_{y_{amp}}$  et  $G_{x_{amp}}$  sont les amplitudes des gradients. Les  $k_y$  varient selon la valeur de l'amplitude  $G_{y_{amp}}$  (figure 1.12) et les  $k_x$  selon la durée  $t$  d'application du gradient  $G_x$  (figure 1.13).

### Remplissage de l'espace de Fourier

La forme des gradients  $G_x(t)$  et  $G_y(t)$  va définir le chemin de lecture dans l'espace de Fourier (figure 1.14).

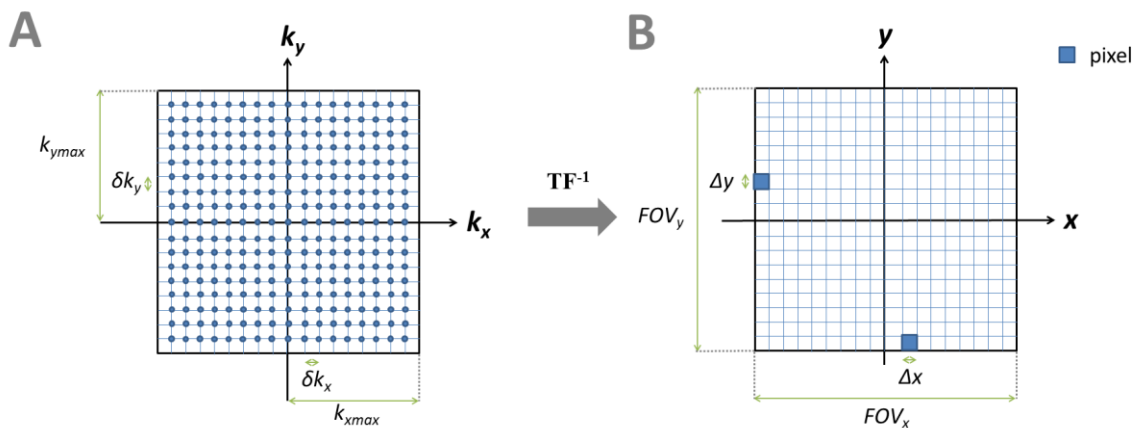


**Figure 1.8 : Principe du remplissage de l'espace de Fourier avec en A) le chronogramme et B) le trajet dans l'espace de Fourier associé.**

Le centre du plan de Fourier qui correspond aux basses fréquences spatiales contient l'information de contraste de l'image alors que le contour du plan qui correspond aux hautes fréquences spatiales contient les détails de l'image 2D.

### De l'espace de Fourier à l'image 2D

Une fois l'espace de Fourier acquis, l'image 2D est obtenue grâce à une transformée de Fourier 2D inverse sur cet espace (figure 1.15).



**Figure 1.9 : De l'espace de Fourier (A) à l'image 2D (B).**

Les dimensions de l'image sont alors liées aux paramètres de l'espace de Fourier.

$$\begin{cases} FOV_x = \frac{2\pi}{\delta k_x} \\ FOV_y = \frac{2\pi}{\delta k_y} \end{cases} \quad (1.21)$$

Le voxel de l'image est alors lié à  $k_{y\max}$  et  $k_{x\max}$  par :

$$\begin{cases} \Delta x = \frac{2\pi}{2k_{x\max}} \\ \Delta y = \frac{2\pi}{2k_{y\max}} \end{cases} \quad (1.22)$$

### 1.2.4.2. Séquences de base

Nous distinguons deux grandes familles de séquence qui sont issues de deux séquences de base en imagerie : la séquence d'écho de spin et la séquence d'écho de gradient. Deux principaux paramètres de ces séquences conditionnent le contraste de l'image : le temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR) (tableau 1.2).

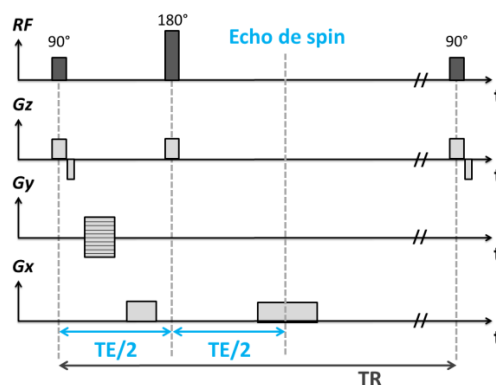
**Tableau 1.2 : Pondération de l'image selon les temps d'écho (TE) et le temps de répétition (TR)**

Pondération	TE court	TE long
TR court	T1	/
TR long	$\rho$	T2

Les images pondérées en T1 et T2 peuvent être intéressantes pour différencier l'eau et la graisse. En effet, ces deux molécules ne possèdent pas les mêmes propriétés magnétiques et possèdent des temps de relaxation T1 et T2 différents. Notamment, la graisse possède un T1 et un T2 beaucoup plus faible que l'eau : de l'ordre de quelques centaines de milliseconde pour le T1 de la graisse contre quelques secondes pour l'eau, ~60ms pour le T2 de la graisse contre ~300ms pour l'eau à 3T.

#### Séquence d'Echo de Spin

L'écho de spin est une séquence caractérisée par une refocalisation des aimantations grâce à une impulsion RF de 180° (figure 1.16).

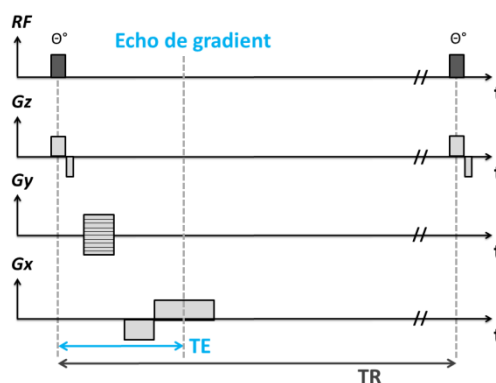


**Figure 1.10 : Chronogramme d'une séquence d'écho de spin**

Cette séquence permet de refocaliser les inhomogénéités du champ magnétique  $\mathbf{B}_0$  et ne pas être soumis à des pertes d'intensité de signal en présence de ces inhomogénéités.

### Séquence d'Echo de gradient

Contrairement à l'écho de spin, ici l'écho de gradient n'utilise pas d'impulsion RF de  $180^\circ$  pour la refocalisation des aimantations. C'est le déphasage suivi du rephasage induit par le gradient de lecture ( $G_x$ ) qui va permettre de créer un écho en utilisant deux gradients d'amplitudes opposés. En l'absence de RF de  $180^\circ$ , l'écho de gradient permet d'avoir un TR plus court que l'écho de spin.



**Figure 1.11 : Chronogramme d'une séquence d'écho de gradient**

Cette séquence permet d'avoir une pondération soit en  $T_1$ , en  $T_2^*$  ou en densité de proton ( $\rho$ ). L'angle de basculement  $\theta$  permet aussi de jouer sur le contraste de l'image, notamment l'utilisation d'un faible  $\theta$  diminue la différence entre deux tissus ayant des  $T_1$  très différents. Cela permet également de pouvoir réaliser des acquisitions très rapides avec un TR très court qui permet de réaliser des acquisitions tridimensionnelles.

## 1.2.5. Imagerie spectroscopique

Les techniques de spectroscopie localisée, comme STEAM et PRESS rencontrées précédemment, permettent de détecter le signal d'un voxel unique. Ces approches ont certains avantages comme une bonne définition du volume qui permet d'éviter une contamination du signal par des signaux externes au volume, une bonne homogénéité du champ  $\mathbf{B}_0$  par optimisation spécifique dans ce volume qui permet d'améliorer la résolution spectrale. Le principal inconvénient de la spectroscopie localisée est qu'elle ne couvre qu'une région limitée de l'organe étudié. Comme pour la biopsie, la localisation restreinte peut entraîner des biais d'échantillonnage, et l'évaluation biochimique de l'organe dans son ensemble, selon une distribution spatiale donnée n'est pas possible. L'imagerie spectroscopique (magnetic

résonance spectroscopique imaging = MRSI, ISRM en français) permet de coder le signal spectroscopique provenant de plusieurs voxels. Les principaux défis de l'ISRM sont : le long temps d'acquisition ; l'inhomogénéité du champ au sein de la région d'intérêt étudiée ; et la contamination du spectre dû aux voxels environnants et enfin le traitement d'un ensemble de données multidimensionnelles.

Dans cette partie, nous allons décrire plusieurs séquences. Parmi toutes les séquences proposées pour l'ISRM, nous nous focaliserons sur les séquences qui ont été étudiées et utilisées dans ce travail de thèse. Nous distinguerons deux formes d'imagerie spectroscopique : celle qui permet d'acquérir un spectre qui devra être quantifié (ici la séquence EPSI : « echo planar spectroscopic imaging ») et celle qui permet d'extraire une information spectroscopique sans nécessairement reconstruire un spectre détaillé (ici la séquence multi-écho de gradient).

### Séquence EPSI (« echo planar spectroscopic imaging »)

L'imagerie spectroscopique « echo-planar » (EPSI) a été proposée à l'origine par Mansfield en 1984 (Mansfield 1984), motivée par la nécessité d'une méthode de spectroscopie *in vivo* avec un court temps TE. La première preuve de faisabilité a été démontrée sur un cerveau humain en 1994 (Posse, DeCarli, et Le Bihan 1994). L'EPSI permet l'acquisition d'un espace de Fourier 3D : deux dimensions spatiales et une dimension spectrale. Cette séquence n'utilise qu'une seule impulsion RF sélective (ici écho de spin, figure 1.18) pour acquérir une ligne de l'espace de Fourier avec  $n$  points dans la dimension spectrale. Un gradient de phase ( $G_y$ , figure 1.18) sélectionne la ligne de l'espace de Fourier et un gradient de lecture oscillant ( $G_x$ , figure 1.18) permet cette fois-ci d'acquérir cette même ligne pour les  $n$  espaces dans la troisième dimension. Dans le cas, d'une acquisition 4D (3D spatiales et 1D spectrale), le gradient  $G_z$  est utilisé pour encoder la troisième dimension spatiale.

L'écart temporel  $\Delta t$  entre deux gradients oscillants détermine le pas d'échantillonnage du signal. La bande passante spectroscopique est alors définie par  $1/\Delta t$ . Une transformée de Fourier 3D permet de reconstruire l'image ainsi que les spectres associés à chaque pixel. Cette séquence peut aussi être utilisée avec un écho de gradient à la place de l'écho de spin.

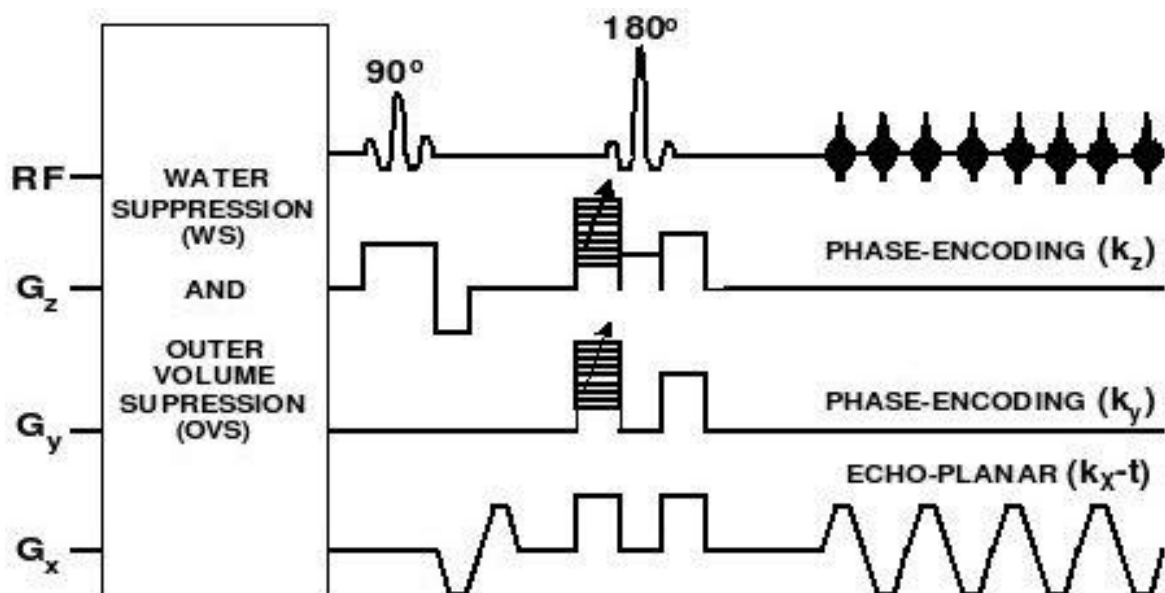


Figure 1.18 : Chronogramme d'une séquence d'imagerie spectroscopique EPSI avec un écho de spin. Les gradients  $G_z$ ,  $G_y$  et  $G_x$  sont respectivement les gradients de sélection de coupe (et encodage dans la troisième dimension spatiale), de phase et de lecture. Extrait de (Bottomley et Griffiths 2016) p187.

### Séquence multi-écho de gradient

La séquence multi-écho de gradient est une séquence très proche de l'EPSI au niveau du chronogramme dans le cas où un écho de gradient est utilisé à la place de l'écho de spin. Le gradient  $G_x$  associé à la lecture peut être bipolaire, comme dans l'exemple de l'EPSI figure 1.18, ou unipolaire (avec « flyback » en anglais) c'est-à-dire que tous les gradients de lecture ont la même polarité. Une comparaison plus détaillée des chronogrammes est faite dans le chapitre 4. La stratégie d'acquisition du signal afin de remonter à une information spectroscopique est détaillée dans les parties 1.3.2 « Taux de graisse » et 1.3.3 « Proportions d'acide gras » de ce chapitre.

## 1.3. Les différents aspects de la quantification lipidique

Dans cette partie, nous nous attacherons à définir ce que nous entendons par *quantification lipidique* avec des techniques de spectroscopie et d'imagerie RMN. En effet, nous pouvons faire rentrer plusieurs métriques dans cette terminologie : certaines destinées à mesurer une quantité, d'autres à évaluer la qualité des lipides (exemple : type d'acide gras). Nous chercherons donc à évaluer, quand cela est possible, pour chaque tissu étudié : le volume (en  $\text{cm}^3$ ), la proportion de graisse par rapport à l'eau (en %), les proportions (en %) des types d'acides gras (polyinsaturés, mono-insaturés et saturés).

### 1.3.1. Mesures volumétriques et anthropométriques

#### Mesures morphologiques traditionnelles

Le syndrome métabolique serait lié à l'accumulation de graisse dans les différentes régions de dépôts de tissu adipeux. Il est donc pertinent de quantifier cette accumulation en mesurant le volume de ces dépôts tel que le tissu adipeux sous-cutané (subcutaneous adipose tissue : SAT) et le tissu adipeux viscéral (visceral adipose tissue : VAT). Comme vu précédemment, le tissu SAT s'étend de la tête au pied alors que le tissu VAT se localise au niveau de l'abdomen. Au cours de cette thèse, nous nous intéresserons seulement à la région abdominale.

Plusieurs outils permettent de mesurer l'excès de graisse allant de la mesure morphologique (poids, IMC, mesure du tour de taille, mesure du tour des hanches, rapport tour de taille/tour des hanches) à des outils d'imagerie tomographique (CT scan, IRM), chacun possédant des avantages et des inconvénients. Les mesures du poids et de l'IMC sont simples à réaliser et accessibles facilement. L'organisme mondial de la santé (OMS) établit qu'un stade d'obésité est atteint pour un IMC  $> 30 \text{ kg/m}^2$  chez l'adulte et de surpoids pour un IMC compris entre 25 et  $30 \text{ kg/m}^2$ . Cependant, l'IMC ne permet pas de différencier les tissus gras des tissus maigres. De plus, il est dépendant de la population étudiée, l'OMS s'accorde à dire qu'un IMC de  $23\text{-}24 \text{ kg/m}^2$  pour un individu de phénotype asiatique est équivalent à un IMC de  $25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$  pour un individu de type caucasien concernant les risques de syndrome métabolique (WHO expert consultation 2004). Plusieurs études suggèrent (Chuang et al. 2006; Qiao et Nyamdorj 2010) que la mesure du rapport tour de taille/tour de hanches (RTH) est un meilleur indicateur pour les risques de diabète que l'IMC. Le RTH permet de définir si l'accumulation de graisse est plutôt gynoïde (accumulation au niveau des fessiers) ou androïde (accumulation au niveau de l'abdomen). Nous avons vu dans la partie précédente qu'une accumulation de graisse gynoïde était moins délétère pour l'organisme car l'excès de graisse se trouve principalement dans le tissu SAT. Le principal inconvénient de la mesure RTH est qu'elle est opérateur dépendant et donc peu reproductible. De plus, le lien entre la mesure RTH et les risques cardiovasculaires dépend encore une fois de la population étudiée (WHO Expert Consultation 2008).

#### Mesure de la composition corporelle par DEXA

Ici la DEXA (« dual energy X-ray absorptiometry ») permet de décomposer la masse corporelle en 3 catégories : la masse maigre, la masse grasse et la masse osseuse. La DEXA

est une technique radiographique qui consiste à effectuer un balayage de l'ensemble du corps avec un faisceau de rayons X à deux niveaux d'énergie pour différencier, dans un premier temps, la masse calcique osseuse des tissus mous ; puis dans un second temps, de diviser ces tissus mous en deux catégories (la masse maigre et la masse grasse). Le dispositif est constitué d'un tube à rayons X de 80 kVp couplé à un filtre k-edge qui permet en sortie d'avoir deux niveaux d'énergie de 40 et 70 keV. Le balayage du site à explorer s'effectue point par point, et la mesure de l'atténuation des deux rayonnements permet d'obtenir une image digitalisée dont chaque surface élémentaire est porteuse d'information.

Le principe de la DEXA est basé sur l'atténuation des photons dans un tissu qui *in vivo* dépend de sa composition chimique. Pour un faisceau unique l'intensité s'exprime :

$$I = I_0 e^{-\mu_m M} \quad (1.23)$$

Où I est l'intensité mesurée,  $I_0$  l'intensité incidente,  $\mu_m$  le coefficient d'atténuation massique et M la masse par unité du tissu absorbant. Si le tissu absorbant est hétérogène, l'équation devient :

$$I = I_0 e^{-\sum f_i \mu_{m_i} M} \quad (1.24)$$

Où  $f_i$  est la fraction massique du  $i^{\text{ème}}$  composant de l'absorbant hétérogène de même pour  $\mu_{m_i}$ . Le coefficient d'atténuation massique  $\mu_m$  peut être calculé selon la composition chimique des composants :

$$\mu_m = \sum (f_i \times \mu_{m_i}) \quad (1.25)$$

Théoriquement, il faudrait trois équations (donc trois niveaux d'énergie) pour distinguer les masses osseuse, maigre et grasse. Ici, la DEXA n'utilise que deux niveaux (un de basse énergie et un de haute énergie). L'atténuation de chaque faisceau (c'est-à-dire  $I/I_0$ ) par les absorbants peut être calculée comme le rapport (R) :

$$R = \frac{\ln(I/I_0)_L}{\ln(I/I_0)_H} = \frac{\sum f_i \times (\mu_{m_i})_L}{\sum f_i \times (\mu_{m_i})_H} \quad (1.26)$$

Avec L faisant référence aux photons de basse énergie et H aux photons de haute énergie.

Chaque élément chimique a un R caractéristique (tableau 1.3) qui permet de déterminer le rapport R des différentes molécules contenues dans les tissus.



**Tableau 1.3 : Coefficient d'atténuation massique  $\mu_m$  à 40 keV et 70 keV et le R correspondant pour 6 atomes. Extrait de (Angelo Pietrobelli et al. 1998)**

Elément	$\mu_m$		R
	40 keV	70 keV	
Hydrogène	0,3458	0,3175	1,0891
Carbone	0,2047	0,1678	1,2199
Oxygène	0,2533	0,1788	1,4167
Sodium	0,3851	0,2022	1,9045
Calcium	1,792	0,5059	3,4536
Fer	3,601	0,8944	4,0162

La valeur du ratio R se rapproche de 1,21 pour les chaînes de triglycéride principalement composées de H, C et O. Pour les fluides intra- et extracellulaires, R est compris entre 1,37 et 1,38. Pour les tissus osseux, ce ratio R est bien supérieur et avoisine les 2,86 (A. Pietrobelli et al. 1996) car ils sont constitués de calcium. Dans une première étape, les pixels provenant de l'os peuvent être distingués de ceux provenant des tissus mous en regardant la valeur du R. Par la suite, un système d'équation à deux inconnues est utilisé pour différencier la masse maigre de la masse grasse. Cependant, le calcul exact pour déterminer la masse grasse et la masse maigre dépend de chaque constructeur et peut donner des résultats différents (Fogelholm et Lichtenbelt 1997). Des erreurs de calcul peuvent survenir selon le niveau d'hydratation des tissus, la composition des tissus étant supposée connue et fixe dans les relations (Angelo Pietrobelli et al. 1998).

L'examen DEXA a l'avantage d'être rapide (entre 5 et 10 min pour l'examen d'un corps en entier). Cependant, il a le désavantage d'utiliser des rayonnements ionisants (même s'ils sont beaucoup moins intenses qu'en tomographie par rayons X). Il faut aussi noter que la mesure de la graisse thoraco-abdominale par la DEXA ne permet pas de distinguer la graisse abdominale sous-cutanée de la graisse abdominale viscérale.

### Mesure des volumes de tissus adipeux

Plusieurs techniques radiographiques permettent de différencier les différents dépôts de tissu adipeux. Les plus courantes sont : le CT scanner à rayons X («computerized tomography») ou l'IRM. Sur les images CT, le contraste est défini par l'absorption des rayons-X par le tissu. Les images CT sont calibrées et leur unité est HU (Hounsfield Unit). L'eau pure a une densité de 0 et seule la graisse présente une unité négative (Ahmadi et al.

2013). La gamme de valeurs correspondant à la graisse dépend alors de la calibration du système CT, du protocole utilisé, du dosage de rayons-X et de l'épaisseur de coupe utilisée. Pour l'IRM, une telle quantification absolue n'est pas envisageable. En plus de l'abondance des séquences IRM, les paramètres d'acquisition comme le TE ou le TR font varier considérablement le contraste des images (pondération en T1, T2 ou densité de proton). Il est toutefois possible de procéder à un traitement post-acquisition pour reconstruire une image paramétrique avec une quantification relative en % comme présentée dans la section suivante (1.3.2). La variété des contrastes en IRM a entraîné une variété de procédures de segmentation automatique qui ne seront pas répertoriées dans ce manuscrit, mais le lecteur peut toutefois se référer à l'article de revue suivante de Houchun Harry Hu, Chen, et Shen (2016).

### 1.3.2. Taux de graisse

Après l'aspect volumétrique, l'autre mesure de *quantification lipidique* qui a émergé en SRM et IRM est la proportion de graisse vis-à-vis de l'eau. Différentes méthodes ont vu le jour ces dernières décennies pour mesurer de façon fiable la proportion de graisse. Historiquement, la SRM était la mesure de référence pour évaluer le taux graisse *in vivo* surtout pour les faibles quantités (Månsson, Peterson, et Johansson 2012) et pour étudier les zones de stockage ectopique comme le foie (Sharma et al. 2009; Hamilton, Yokoo, et al. 2011), le cœur (Meer et al. 2007), dans le muscle squelettique (Sinha et al. 2002; Weis et al. 2005; Boesch et al. 2006) et dans la moelle osseuse (Pansini et al. 2014; Karampinos et al. 2015). Cependant, différents types d'imagerie permettent aussi d'observer le taux de graisse : l'imagerie sélective en fréquence (Frequency-selective imaging) et l'imagerie d'encodage du déplacement chimique (Chemical shift-encoded imaging). L'imagerie sélective en fréquence permet d'exciter soit l'eau soit la résonance principale de la graisse ce qui résulte en une image où l'une des deux composantes est en hyper-signal. Cette méthode a montré son intérêt pour l'étude du contenu du taux de graisse dans le muscle squelettique (Machann et al. 2003), les tissus adipeux (Makrogiannis et al. 2012) et le foie (Machann et al. 2006). Cependant, ce type d'imagerie, s'il met en contraste les zones contenant de la graisse, ne permet pas d'obtenir une quantification standardisée. L'encodage du déplacement chimique quant à lui n'utilise pas d'impulsion RF spectrale, mais mesure l'effet du déplacement chimique à différents temps d'écho. Notamment, pour étudier la quantité de graisse en fonction de l'eau, la différence de phase entre l'eau et le groupement de méthylène est utilisée. Un traitement

post-acquisition est alors nécessaire et permet d'estimer la densité de proton composant les molécules d'eau et la densité de proton composant les molécules lipidiques. Ceci permet alors d'obtenir un coefficient normalisé en pourcentage (densité de proton de la graisse/(densité de proton de la graisse et de l'eau)). Le signal de la graisse peut être modélisé soit par le pic de méthylène seul ou par les différents pics présentés dans la section 1.2.2 sachant que cette dernière option des résultats plus précis.

Ici, la stratégie est de définir un espacement entre les échos ( $\Delta TE$  « echo spacing ») de sorte de jouer sur l'évolution du signal et les différences de déplacement chimique de sorte qu'au moment de l'acquisition (à chaque TE) l'eau et la graisse soit déphasées d'une phase de  $\pi$  ce qui correspond à un écart entre les échos de:

$$\Delta TE = \frac{1}{2 \cdot \Delta\delta_{eau-graisse} \cdot B_0 \frac{\gamma}{2\pi}} \quad (1.27)$$

Avec  $\Delta\delta_{eau-graisse}$  égale à 3,4 ppm à 37°C,  $B_0$  la valeur du champ magnétique en Tesla et  $\gamma/2\pi$  le rapport gyromagnétique du proton (soit 42,576 MHz/T).

En définissant les différents TE par :

$$TE = n \cdot \Delta TE \quad (1.28)$$

Cette méthode dérive de la Dixon traditionnelle (Dixon 1984). Cependant d'autre TE peuvent être pris, comme dans l'algorithme IDEAL (« Iterative Decomposition of water and fat with Echo Asymmetry and Least-squares estimation »), où le but est d'avoir une position asymétrique entre l'eau et la graisse à chaque TE (Reeder et al. 2004).

Par la suite, la partie réelle ( $\Re$ ) du signal est définie comme la somme de la contribution de l'eau et des différentes résonances de la graisse :

$$S(TE) = \Re \left( \left( DP_{eau} + DP_{graisse} \times \sum_{k=1}^8 C_k e^{2\pi i \Delta f_k TE} \right) \times e^{\frac{-TE}{T2^*}} \right) \quad (1.29)$$

Dans cette première approximation, les amplitudes relatives des pics de résonance  $C_k$  et les différences fréquentielles  $\Delta f_k$  entre les résonances lipidiques et le pic de l'eau (signal centré sur le pic de l'eau) sont fixées. La densité de proton de l'eau  $DP_{eau}$  et celle de la graisse  $DP_{graisse}$  ainsi qu'un  $T2^*$  apparent sont estimés.

La fraction de graisse en densité de proton (PDFF : proton density fat fraction) est alors calculée par :

$$PDFF = \frac{DP_{graisse}}{DP_{graisse} + DP_{eau}} \times 100 \quad (1.30)$$

La plupart du temps, les effets des différences de T1 et de T2 sont ignorés. En utilisant une séquence multi-écho de gradient avec un faible angle de basculement (de l'ordre de 5°), nous pouvons négliger les effets de la pondération en T1. La PDFF présente l'avantage d'être normalisée et comprise entre 0 et 100 %. Cette mesure est reconnue aujourd'hui comme un biomarqueur (Reeder, Hu, et Sirlin 2012) de la quantité de graisse dans le foie.

Si les techniques de SRM et d'IRM permettent de mesurer le taux de graisse dans chaque pixel, à l'échelle du corps entier, des mesures DEXA permettent d'accéder à la masse maigre et à la masse grasse ou encore par impédancemétrie (non détaillée dans cette thèse) peuvent être réalisées.

### 1.3.3. Proportions d'acide gras

#### Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une technique qui permet de séparer plusieurs molécules contenues dans un mélange. Ce dernier est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. Ceci permet alors de distinguer les différents types d'acides gras (exemple C18 :1n7) comme présenté dans la figure 1.19.

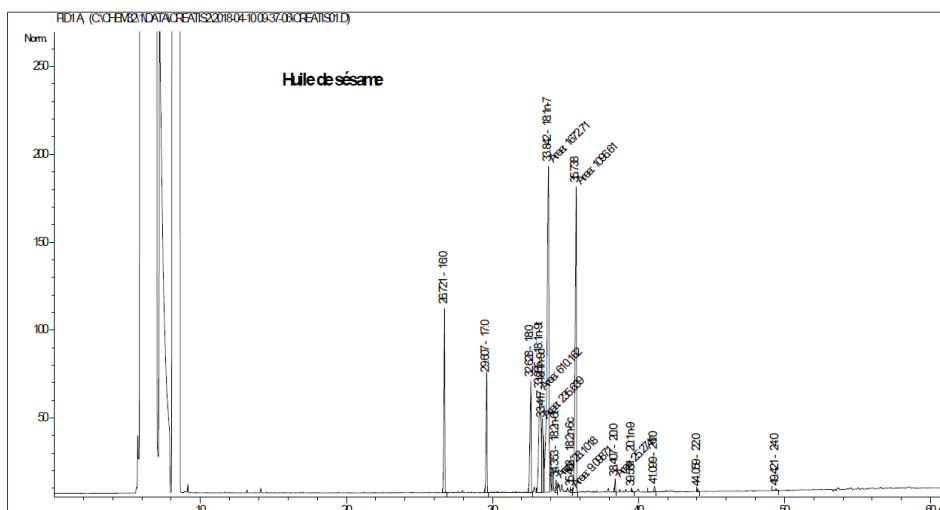


Figure 1.19 : Spectre d’huile de sésame issu de la chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse est considérée comme une mesure de référence pour la quantification en acide gras. Plusieurs études résumées dans le tableau 1.4 ont caractérisé la composition lipidique des tissus adipeux sous-cutanés.

Tableau 1.4 : Composition lipidique du tissu adipeux sous-cutané estimée par chromatographie en phase gazeuse

	PUFA (%)	MUFA (%)	SFA (%)
(Field, Angel, et Clandinin 1985)	14,4 ± 2,7	57,5 ± 3,1	26,0 ± 3,0
(Garaulet et al. 2006)	18	54,6	27,4
(Hodson, Skeaff, et Fielding 2008)	16,5	54	29,5
(Lundbom et al. 2010)	12,35	58,29	29,36

La chromatographie en phase gazeuse permet une quantification précise des différents acides gras présents dans l’échantillon. Cependant, l’analyse se faisant *in vitro*, elle nécessite par conséquent des biopsies des tissus qui en limitent son utilisation.

## La spectroscopie RMN

La spectroscopie permet de remonter à une information qualitative de la graisse, notamment sur les proportions des différents types d'acide gras en se fondant sur le signal d'une chaîne de triglycéride. A l'échelle de la molécule de triglycéride, nous pouvons alors définir 3 paramètres qui vont varier selon la composition des acides gras estérifiés (Hamilton, Yokoo, et al. 2011): ndb (nombre moyen de double liaison), nmidb (nombre moyen de méthylène interrompant de deux doubles liaisons) et CL (longueur moyenne de la chaîne carbonée) (Tableau 1.4).

**Tableau 1.4 : Détail des groupements chimiques présents dans une chaîne de triglycéride. ndb (nombre de double liaison), nmidb (nombre de méthylène interrompant de deux doubles liaisons) et CL (longueur de la chaîne carbonée).**

Groupement chimique	Déplacement chimique (ppm)	Amplitude théorique d'un groupement dans une molécule (Hamilton, Yokoo, et al. 2011)
-CH=CH-	5,3	2*ndb
-CH-COO-	5,2	1
-CH <sub>2</sub> -COO-	4,3	2
-CH <sub>2</sub> -COO-	4,2	2
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2,8	2*nmidb
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	2,23	6
-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	2,03	4*(ndb - nmidb)
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	1,6	6
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	1,3	[6*(CL-4) - 8*ndb + 2*nmidb]
-CH <sub>3</sub> -	0,9	9

Pour remonter à la composition lipidique, c'est-à-dire à la proportion d'acide gras polyinsaturé, mono-insaturé et saturé, plusieurs métriques ont vu le jour ces dernières années. Elles se basent essentiellement sur des rapports d'amplitudes de pics. Le tableau ci-dessous permet de faire le lien entre les différents indices utilisés dans la littérature et les notations ndb et nmidb.

**Tableau 1.5 : Méthodes de calcul d'indice d'insaturation ou de polyinsaturation. UFA : proportion d'acide gras insaturé en %, PUFA : proportion d'acide gras polyinsaturé en %), UI : indice d'insaturation, PI : indice de polyinsaturation.  $A_{picX}$  représente l'amplitude du signal pour le pic résonnant à X ppm.**

	Insaturation	Polyinsaturation
<b>(Corbin et al. 2009)</b>	$UFA = 100 \times \frac{3}{4} \times \frac{A_{pic2,03}}{A_{pic0,9}}$	$PUFA = 100 \times \frac{3}{2} \times \frac{A_{pic2,8}}{A_{pic0,9}}$
<b>(Ren et al. 2008)</b>	$UFA = 100 \times \frac{1}{2} \times \frac{A_{pic2,03}}{A_{pic2,23}}$	$PUFA = 100 \times \frac{A_{pic2,8}}{A_{pic2,23}}$
<b>(Zancanaro et al. 1994)</b>	$UFA = 100 \times \frac{3}{2} \times \frac{A_{pic5,3}}{A_{pic0,9}}$	$PUFA = 100 \times \frac{3}{2} \times \frac{A_{pic2,8}}{A_{pic0,9}}$
<b>(Peterson et Månsson 2013)</b>	$UFA = 100 \times \frac{ndb - nmidb}{3}$	$PUFA = 100 \times \frac{nmidb}{3}$
<b>(Machann et al. 2017)</b>	$UI = \frac{A_{pic5,3}}{A_{pic0,9}}$	$PUI = \frac{A_{pic2,8}}{A_{pic0,9}}$

Ici les notations UFA et PUFA font référence à une valeur moyenne d'insaturé et de polyinsaturé. Les proportions de monoinsaturés (MUFA) et saturés (SFA) sont par la suite calculées par : MUFA = UFA – PUFA

$$SFA = 100 - UFA$$

Si on se base sur l'analyse d'une chaîne de triglycéride (tableau 1.6), les ratios de Corbin *et al.*, de Ren *et al.* et de Peterson et Mansson sont équivalents. Seul le ratio de Zancanaro *et al.* diffère pour le calcul de l'insaturation. De plus, il est aussi facile de faire le lien avec les indices UI et PUI. D'autres ratios comme le  $A_{pic5,3}/A_{pic1,3}$  et le  $A_{pic2,8}/A_{pic1,3}$  utilisés par Lundbom *et al.* (2010) montrent une bonne corrélation avec la chromatographie en phase gazeuse pour des spectres à TE long (200 ms et 135ms) mais donnent de mauvaises corrélations à TE court (30 ms). De plus, il est difficile de les comparer avec les autres indices trouvés dans la littérature.

## Imagerie RMN

Depuis 2011, de nouvelles méthodes émergentes ont été développées pour estimer la composition lipidique à partir de séquence d'imagerie (Bydder, Girard, et Hamilton 2011; Peterson et Månsson 2013; Benjamin Leporq et al. 2014). Le tableau 1.7 répertorie les publications utilisant des méthodes RMN (IRM et/ou SRM) pour la quantification lipidique de différents dépôts de tissu adipeux blanc au niveau abdominal (SAT profond, SAT superficiel, VAT), au niveau de la cuisse, de la nuque et dans la moelle osseuse. La séquence d'imagerie utilisée est une séquence multi-écho de gradient mais dans la littérature, nous la retrouvons souvent sous l'appellation « chemical shift encoded MR imaging » (CSE-MRI). Pour l'estimation de la composition lipidique, le  $\Delta TE$  peut être choisi dans le but d'obtenir de manière répétée les aimantations de l'eau et de la graisse soit en phase, soit en opposition de phase pour les différents TE. Cette fois-ci, au lieu de fixer les proportions des différentes résonances, celles-ci sont exprimées en fonction de  $ndb$  et  $nmidb$  (Tableau 1.5). Le signal peut alors s'exprimer par :

$$f(t) = real \left( \left[ Aw \times n_{water} + Af \times \sum_{k=1}^8 \left( n_k (ndb, nmidb, CL) \times e^{2\pi i \Delta f_k TE} \right) \right] \times e^{\frac{-TE}{T2^*}} \right) \quad (1.31)$$

Dans ce cas, un  $T2^*$  commun est estimé pour l'eau et la graisse. Cependant, ce choix est discutable du fait que l'eau et la graisse ne possède pas des  $T2$  apparents identiques (Peterson, Svensson, et Månsson 2014).



**Tableau 1.7 : Résultats des paramètres relatifs à la composition lipidique des tissus adipeux humains de la littérature**

	B0	Nombre de sujets	Méthode	Tissus	ndb	nmidb	PUFA (%)	MUFA (%)	SFA (%)
(Ren et al. 2008)	7T	20	MRS STEAM	SAT	2,8	0,75	25	43,3	31,7
				SAT			23,4 ± 3,9	49,6 ± 5,7	27,1 ± 4,2
				Moelle osseuse			24,5 ± 3,1	46,4 ± 4,8	29,1 ± 3,5
(Bydder, Girard, et Hamilton 2011)	3T	1	MRI	SAT (profond)	2,81 ± 0,02	0,73	24,5	44,7	30,8
				VAT	2,76 ± 0,04	0,71	23,6	44,8	31,6
			MRS STEAM	SAT (profond)	2,82	0,81	27	40	33
				VAT	2,83	0,79	26,3	41,7	32
(Peterson et Månsson 2013)	3T	1	MRS STEAM	SAT (cuisse)	3,52 ± 0,18	0,71 ± 0,05	23,7	70	6,3
			MRI	SAT (cuisse)	2,83 ± 0,47	0,74 ± 0,17	24,7	45	30,3
(Benjamin Leporq et al. 2014)	3T	5	MRI	SAT	2,72	0,94	31,2	28,2	40,6
				VAT	2,53	0,84	27,9	28,7	43,4
(Hamilton et al. 2017)	3T	340	MRS STEAM	VAT	2,72 ± 0,19	0,69 ± 0,14	22,9	45	32,1
				SAT (superficiel)	2,83 ± 0,2	0,74 ± 0,15	24,6	45,1	30,3
				SAT (profond)	2,8 ± 0,17	0,75 ± 0,13	24,8	43,6	31,6
(Machann et al. 2017)	3T	50	MRS STEAM	SAT (nupe)	2,46	0,46	15,3	51,5	33,2
				SAT (profond)	2,46	0,45	14,9	52,4	32,7
				SAT (superficiel)	2,67	0,49	16,2	56,6	27,2
				VAT	2,36	0,45	14,9	48,9	36,2
				Moelle osseuse	2,33	0,42	14	49,7	36,3
				SAT (cuisse)	2,8	0,43	14,3	64,8	20,9

# Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que l'adiposité abdominale et la résistance à l'insuline étaient au cœur du syndrome métabolique. Ce dernier étant lié à un risque plus élevé de développer des maladies liées au métabolisme comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou encore les stéatoses hépatiques non-alcooliques. Pour mieux comprendre les mécanismes liés au syndrome métabolique, il est nécessaire d'avoir des méthodes qui nous permettent d'évaluer l'adiposité abdominale. Nous savons aussi que les paramètres d'IMC et de RTH utilisés comme seul indicateur de santé conduisent souvent à une mauvaise classification de la présence de facteurs de risques cardio-métaboliques (Tomiya et al. 2016). Il est alors indispensable de posséder des méthodes plus précises telles que celles fournies par l'imagerie. Cependant, si les images CT donnent une résolution spatiale et une définition des organes remarquables, cette méthode est ionisante et ne peut être appliquée éthiquement sur des sujets sains. Au-delà de l'aspect volumique, nous pouvons aussi évaluer l'adiposité abdominale vis-à-vis de sa composition en acide gras. Dans ce contexte, ce manuscrit décrit des méthodes non-invasives basées sur la résonance magnétique du noyau d'hydrogène (RMN) : l'imagerie (IRM) et la spectroscopie (SRM). Nous étudions la faisabilité de détecter des changements volumétriques et qualitatifs (nature des acides gras : saturés (SFA), mono-insaturés (MUFA) ou polyinsaturés (PUFA)) des adiposités abdominales et du foie, plus particulièrement, dans la phase de prise de poids.

# Chapitre 2

## Estimation de la composition en acide gras à partir du signal de spectroscopie

### Sommaire

---

2.1. Traitements des signaux de spectroscopie.....	44
2.2. Comparaison d'un modèle dérivé de l'imagerie avec un modèle classique pour l'estimation de la composition lipidique à partir du signal de spectroscopie.....	46
2.2.1. Introduction .....	47
2.2.2. Materials and methods.....	48
2.2.3. Results .....	55
2.2.4. Discussion .....	62
2.2.5. APPENDIX .....	67
Conclusion .....	70

---

Ce deuxième chapitre est dédié à l'analyse du signal de spectroscopie dans le cas de l'étude des composés gras tels que les huiles (pour les mesures *in vitro*) ou le tissu adipeux humain (pour les mesures *in vivo*). Nous avons vu dans le chapitre précédent que le signal lipidique était riche et complexe à modéliser (1.2.2). Dans la première partie de ce chapitre, nous verrons brièvement les problématiques qui sont inhérentes aux traitements du signal de spectroscopie ainsi que différentes méthodes de quantification élaborées pour l'étude du spectre des métabolites.

## 2.1. Traitements des signaux de spectroscopie

Dans un premier temps, la spectroscopie RMN permet une inspection visuelle du spectre pour détecter ou non la présence de certaines résonances. La quantification de ce spectre peut permettre de mesurer les concentrations relatives des différentes résonances. Plusieurs méthodes, principalement développées pour l'étude de la concentration des métabolites dans le cerveau, sont utilisées dans la littérature (Vanhamme, van den Boogaart, et Van Huffel 1997; Provencher 1993, 2001; Ratiney et al. 2004; Pouillet et al. 2007; Osorio-Garcia et al. 2011). Certaines sont fondées sur l'analyse du spectre (domaine fréquentiel) et d'autres sur l'estimation du signal de pression libre «FID» (domaine temporel). Nous parlerons ici d'une estimation des concentrations relatives. Le signal reçu dépend de l'imageur, des capteurs utilisés, de la séquence utilisée (par exemple PRESS ou STEAM), des paramètres de séquence (TE et TR) et des temps de relaxation des groupements de protons. Il est par conséquent difficile de faire une estimation absolue. Dans ce cas, l'utilisation d'une référence interne ou externe (méthode ERETIC (Akoka, Barantin, et Trierweiler 1999)) permettrait la calibration des mesures.

Historiquement, les premières analyses de spectres ont été réalisées dans le domaine de la chimie utilisant de la RMN à haute résolution ce qui leur permet d'avoir une bonne distinction des pics de résonance dans le domaine fréquentiel. Dans ce cas-là, l'estimation de la concentration peut se faire en prenant l'aire sous la courbe de chaque pic du spectre. Cependant, dans le cas de spectres *in vivo*, la résolution n'est pas suffisante pour pouvoir appliquer cette méthode. En effet, les inhomogénéités du champ ont pour conséquence d'accélérer la décroissance du signal, ce qui induit un élargissement des raies dans le domaine fréquence. Il peut alors y avoir des pics de résonance qui se superposent. En plus de ce problème, des distorsions de la ligne de base dues à une variation de la phase au cours du temps (comme produites à TE courts par des courants de Foucault) peuvent aussi introduire

des biais de mesure dans le calcul de l'intégrale sous la courbe. Enfin, *in vivo* les durées d'examen limitent le temps d'acquisition des données, ainsi le nombre d'accumulation du signal est réduit d'où des rapports signal à bruit (signal to noise ratio : SNR en anglais) plus faibles.

De là s'en est découlé la nécessité d'utiliser des analyses plus perfectionnées qui permettraient de prendre en compte la forme des raies (lorentzienne, gaussienne et voigt) et qui soient automatiques. Que ce soit dans le domaine fréquentiel (revue de Mierisová et Ala-Korpela 2001) ou temporel (revue de Vanhamme et al. 2001), la fonction qui décrit le signal acquis est un modèle non-linéaire (i.e. avec des paramètres non linéaires à ajuster) et la façon la plus courante d'ajuster le modèle est d'utiliser un moindres carrées non linéaire. En fréquentiel, chaque résonance est caractérisée par une fréquence, une amplitude et une largeur de raie. En temporel, nous retrouvons aussi les paramètres fréquence et amplitude (qui correspond plutôt à l'aire sous la courbe en fréquentiel), la largeur de raie, quant à elle, est remplacée par le facteur d'amortissement.

Ici nous avons adopté plusieurs stratégies et étapes dans le traitement de nos spectres utilisant séquentiellement les domaines fréquentiel et temporel. Dans une première étape nous faisons une correction de la phase dans le domaine temporel (2.2.2.3). Puis, nous utilisons le domaine fréquentiel pour déterminer la fréquence de résonance de nos pics. Pour cela, des fréquences initiales sont définies manuellement avant le début du processus. Puis une recherche du maximum du pic est effectuée sur un intervalle fixe pour chaque fréquence initiale. Une fois ces fréquences connues, elles peuvent être injectées dans le modèle temporel comme connaissance *a priori* initiale avec la possibilité d'être recherchées dans un intervalle (cas pour le modèle simplifié  $M_{\text{peak}}$  dans la partie 2.2), ou encore fixées à cette valeur (cas pour le modèle simplifié  $M_{\text{TG}}$  dans la partie 2.2), Une première estimation des T2 peut aussi être réalisée dans le domaine fréquentiel (2.2.2.4) pour être incluse dans le modèle  $M_{\text{TG}}$ , si les spectres sont acquis à plusieurs TE. Enfin, avec ou sans les connaissances *a priori*, l'approximation finale qui permet de déterminer les amplitudes des résonances est réalisée dans le domaine temporel (2.2.2.1).

### [Problématique dans le cas du signal lipidique](#)

En 2014, Mosconi et al. ont montré que le résultat de la quantification dépendait de la méthode utilisée, ce qui complique la comparaison d'une étude à l'autre. De plus, l'estimation paramétrique par moindres carrés non linéaires appliquée aux spectres RMN des lipides peut être, selon la fonction modèle utilisée, un problème non linéaire mal posé. Ceci donne lieu

alors à une grande source de variabilité dans les résultats, puisque plusieurs valeurs de paramètres peuvent être trouvées pour un même minimum. Cependant, dans notre communauté de SRM *in vivo*, plusieurs articles présentent des modèles toujours plus complexes, en ajoutant de plus en plus de raies de résonance afin de réduire le résidu entre la courbe estimée et la partie réelle du signal acquis. Ces pics sont généralement proches en fréquence et l'augmentation du nombre de paramètres rend le problème mal posé. Dans ce cadre, nous nous sommes demandé s'il n'y avait pas un autre moyen de réaliser cette analyse paramétrique. Fondée sur des travaux en spectroscopie (Hamilton, Yokoo, et al. 2011) qui ont proposé de nouvelles définitions des paramètres liés à la structure d'une chaîne de triglycéride, l'imagerie quantitative (Peterson et Månsson 2013; Benjamin Leporq et al. 2014) a montré des résultats prometteurs tout en utilisant un modèle d'ajustement paramétrique simplifié. Nous avons adapté ce modèle à l'étude du signal de spectroscopie avec différentes stratégies et implémentations (sous-échantillonnage du signal, prise en compte des temps de relaxation, contraintes liant les paramètres entre eux). Le but étant d'explorer une nouvelle stratégie pour traiter les spectres RMN des lipides issus de tissu adipeux humain acquis à 3T. Cette analyse fait l'objet de la partie suivante du chapitre

## **2.2. Comparaison d'un modèle dérivé de l'imagerie avec un modèle classique pour l'estimation de la composition lipidique à partir du signal de spectroscopie**

This section corresponds to the accepted manuscript of the article: "Comparison of MRI-derived vs. traditional estimations of fatty acid composition from MR spectroscopy signals" A. Nemeth, B. Segrestin, B. Leporq, A. Coum, G. Gambarota, K. Seyssel, M. Laville, O. Beuf, H. Ratiney. Comparison of MRI-derived vs. traditional estimations of fatty acid composition from MR spectroscopy signals. *NMR in Biomedicine*, 2018;31(9):e3991, which has been published in final form at [<https://onlinelibrary-wiley-com.docelec.univ-lyon1.fr/doi/abs/10.1002/nbm.3991>]. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with the Wiley Self-Archiving Policy [<https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing-open-access/open-access/self-archiving.html>].

## 2.2.1. Introduction

Interest in fat quantification has grown in recent years. In particular, the fat composition in the body could play a role in various inter-related pathologies or disorders such as obesity, inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease risk. It is therefore worth developing accurate and robust tools to measure and follow the fatty acid composition in the body noninvasively. In this respect, Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) has been shown to be a quantitative, noninvasive technique that can assess this fat composition (Zancanaro et al. 1994; Ren et al. 2008; Strobel, Hoff, and Pietzsch 2008; Corbin et al. 2009; Lundbom et al. 2010; Hamilton, Yokoo, et al. 2011). The spectral content of the  $^1\text{H}$  lipid spectrum, e.g., acquired in adipose tissue (Hamilton et al. 2017; Machann et al. 2017), bone marrow (Ren et al. 2008; Machann et al. 2017) or liver fat (Hamilton, Yokoo, et al. 2011; Lundbom et al. 2011), is related to the types of triglycerides (saturation, unsaturation, polyunsaturation). The different types of triglycerides are obtained from the quantification of the area under the curve (in the spectral domain) or equivalently from the signal amplitude (in the time domain) of the different proton components. In this context, Hamilton et al. (Hamilton, Yokoo, et al. 2011) introduced the notion of the number of double bonds (*ndb*), the number of double bonds separated by a single  $\text{CH}_2$  (*nmidb*, the number of methylene-interrupted double bonds) and chain length (*CL*). These triglyceride (TG) parameter values link the amplitude of each resonating peak. With these relations, indexes related to the percentage of saturated fatty acids (SFAindx), monounsaturated fatty acids (MUFAindx), and polyunsaturated fatty acids (PUFAindx) can be deduced. Until now, proton peaks have been quantified by quantification algorithms such as AMARES (Advanced Method for Accurate Robust and Efficient Spectral) (Leentje Vanhamme, van den Boogaart, and Van Huffel 1997), LCMModel (Linear Combination of Model spectra) (Provencher 1993, 2001), Automated Quantification of Short Echo-time MRS (AQSES)-Lineshape (Pouillet et al. 2007; Osorio-Garcia et al. 2011), and quantitation based on QUantum ESTimation (QUEST) (Ratiney et al. 2004). However, as has been recently demonstrated in (Mosconi et al. 2014), the quantification results can greatly differ from one quantification algorithm to another, which could influence the statistical outcome of a biological investigation. Moreover, next to these dedicated MRS quantification approaches, quantitative MR imaging using multigradient echo sequence (MGE-MRI) has recently been proposed (Bydder, Girard, and Hamilton 2011; Peterson and Månsson 2013; Benjamin Leporq et al. 2014, 2016; B. Leporq et al. 2017). These MGE-MRI approaches proved their ability to quantify TG fatty acid

composition, from far fewer spectroscopic data points (i.e., 1024 points compared to 8–15 echoes). To make this possible, this approach relies on more assumptions than in the MRS quantification approaches as well as directly estimated  $ndb$ ,  $nmidb$  and  $CL$  based on a simplified model. Then the question arises as to whether MRI approaches can be adapted to the MR spectroscopic signal and how their statistical performance would compare with the usual MRS quantification methods.

In this paper, we therefore investigated several quantification strategies – derived from the MGE-MRI approach or employing the usual MRS approaches – in particular the quantitative analysis of the spectroscopic adipose tissue lipid signal. In the continuation of the work reported in (Mosconi et al. 2014) analyzing the results of different quantification methods, we analyzed possible sources of error and discrepancies between different quantification approaches. The aim of this study was to evaluate and reduce the uncertainties and errors of estimates. After Monte Carlo studies examining several fitting implementations, the quantification results obtained with different quantification models, including results from the reference LCMoel method, were analyzed for *in vitro* oil acquisitions and *in vivo* spectroscopy subcutaneous adipose tissue (SAT) acquisitions. These analyses resulted in a number of practical solutions and considerations for robust lipid composition assessment using MR spectroscopic signals.

## 2.2.2. Materials and methods

### 2.2.2.1. Model function and quantification strategies

Most of the current MRS quantification methods are based on a nonlinear least squares analysis that fits the acquired spectroscopic data points with a parametric model function. Note that in the following “quantification” means “relative quantification” and the goal, for all the methods studied, is to determine from a MR spectroscopy signal, the relative contribution of PUFA<sub>indx</sub>, MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub> within the triglycerides. Here the model functions studied in this paper are presented. The constraints, prior knowledge used as well as several implementation details are also given.

The relations, given in table 2.1, link the proton peak amplitudes (Hamilton, Yokoo, et al. 2011) of a lipid spectrum by introducing TG parameter variables, especially  $ndb$  and  $nmidb$ . These parameter variables are 1) directly fitted as they are explicitly introduced into the parameterized model function used in the first quantification approach (called  $M_{TG\_param}$ ,



described below) or 2) deduced from the fitted component amplitude in the second quantification approach (called  $M_{\text{peak}}$ , described below), as was done in previous MRS publications (Zancanaro et al. 1994; Ren et al. 2008; Corbin et al. 2009; Strobel, Hoff, and Pietzsch 2008). Once  $ndb$  and  $nmidb$  are estimated, the fatty acid composition (percentage of MUFA<sub>indx</sub>, PUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub>) can be computed according to the relation given in Peterson and Mansson (Peterson and Månsson 2013) and recalled in the Appendix.

**Table 2.1: Knowledge of the theoretical relative amplitude of the resonance associated with the chemical structure of a typical triglyceride can be either injected in the model ( $M_{\text{TG\_param}}$ ) or be used a posteriori for fat composition assessment ( $M_{\text{peak}}$ ).  $f_{0k}$  chemical shift of each resonance  $k$ ;  $ndb$  number of double bonds;  $nmidb$  number of methylene-interrupted double bonds; CL chain length (6).**

Parameters conditioning the fat spectrum models				
		$M_{\text{TG\_param}}$ ( $A_w, A_f, ndb, nmidb, T2^*$ )		$M_{\text{peak}}$ ( $\alpha_1, \dots, \alpha_9, c_1, \dots, c_9$ )
$k$		$f_{0k}$ (ppm)	$n_k(ndb, nmidb, CL)$	$c_k$
1	-CH=CH-	5.29	$2 * ndb + 1$	$A_f * (2 * ndb + 1)$
2	-CH <sub>2</sub> -COO	4.2	2	$A_f * 2$
2b	-CH <sub>2</sub> -COO	4.3	2	$A_f * 2$
3	-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2.75	$2 * nmidb$	$A_f * 2 * nmidb$
4	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO	2.24	6	$A_f * 6$
5	-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	2.02	$4 * (ndb - nmidb)$	$A_f * 4 * (ndb - nmidb)$
6	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO	1.6	6	$A_f * 6$
7	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	1.3	$6 * (CL - 4) - 8 * ndb + 2 * nmidb$	$A_f * (6 * (CL - 4) - 8 * ndb + 2 * nmidb)$
8	-CH <sub>3</sub>	0.9	9	$A_f * 9$
9	H <sub>2</sub> O	4.7	$n_{\text{water}} = 2$	$A_w * 2$

### [M<sub>TG\\_param</sub> quantification approach](#)

The first  $M_{\text{TG\_param}}$  quantification approach studied stems from lipid composition quantification using MGE-MRI (Benjamin Leporq et al. 2014). It is based on the following model function:

$$f(t) = \left( (Aw * n_{water} * e^{-\frac{(TE+t)}{T2_w}} + Af * \sum_{k=1}^8 \left( n_k(ndb, nmidb) * e^{2\pi i f_k t} * e^{-\frac{(TE+t)}{T2_k}} \right) * e^{-\frac{t}{T2'}} \right) \quad [1]$$

where  $Aw$  is the number of water molecules,  $Af$  the number of triglyceride molecules,  $n_{water}$  the number of protons in a water molecule,  $n_k(ndb, nmidb, CL)$  the number of protons for each resonance peak, as a function of  $ndb$ ,  $nmidb$  and  $CL$  as described by Hamilton et al. (Hamilton, Yokoo, et al. 2011).  $f_k$  is the frequency of each resonance,  $T2_k$  the transverse relaxation time for each peak,  $T2_w$  the transverse relaxation time of the water, and  $T2'$  the global relaxation term due to  $B_0$  heterogeneities. The water resonance was used as the reference resonance, the frequencies  $f_k$  were set at  $(f_{0_k} - 4.7) * B_0 * \gamma / 2\pi$  with  $f_{0_k}$  the chemical shift (see table 2.1) of the  $k^{\text{th}}$  peak (in ppm),  $B_0$  the static magnetic field (in T) and  $\gamma$  the gyromagnetic ratio of the proton (in  $\text{Hz} \cdot \text{T}^{-1}$ ). TE is the echo time corresponding to the localized spectroscopy sequence used. The parameter  $ndb$  is the number of double bonds,  $nmidb$  the number of methylene-interrupted double bonds and  $CL$  the chain length. As detailed below, these three entities, plus  $Aw$  and  $Af$ , are estimated through a fitting procedure whose implementation is the same as the quantitative MGE-MRI method given in (Benjamin Leporq et al. 2014). Briefly in (Benjamin Leporq et al. 2014),  $ndb$  and  $nmidb$  are estimated separately, through three subprocesses and using strong assumptions linking  $ndb$ ,  $nmidb$  and  $CL$ . The three subprocesses are 1) estimation of the proton density fat fraction (PDFF) and  $T2'$ , which are set in the next subprocess; 2) estimation of  $ndb$  while linking  $nmidb$  and  $CL$  to  $ndb$  and 3) estimation of  $nmidb$  while  $ndb$  and  $CL$  are linked to  $nmidb$  (Benjamin Leporq et al. 2014). In the last two steps, the relations between  $ndb$ ,  $nmidb$  and  $CL$  were:  $nmidb = 0.093 * ndb^2$  and  $CL = 16.8 + 0.25 * ndb$  as used by Bydder et al. (Bydder, Girard, and Hamilton 2011). The aim of this implementation was to have a robust fitting procedure. Note that it is possible, in the implementation, not to use any connection between  $ndb$  and  $nmidb$ . The other parameters, especially  $T2_k$  and  $T2_w$ , are set to assumed values.

When fitting in the time domain, the time samples used in the fitting procedure can be defined. Considering this point, we tested the possibility of applying the fit on undersampled data to come closer to what is performed in the quantitative MGE-MRI approaches. In these

approaches, the sampling period is limited by echo spacing. Moreover, in the MGE-MRI methods, a single  $T2^*$  for all peaks is fitted and there is no T2 weighting of the first point (expressed in equation 1 by  $\exp(-TE/T2_k)$ ) because these methods are not subjected to the echo time delay of localized MR spectroscopy such as in the PRESS sequence.

Consequently, four implementations were studied using the  $M_{TG\_param}$  approach [1]: 1) with full sampling and without T2 correction (named  $M_{TG\_param\_fullsampling}$ ), 2) with full sampling and with individual T2 correction (named  $M_{TG\_param\_fullsampling\_T2cor}$ ), 3) with undersampling and without T2 correction (named  $M_{TG\_param\_undersampling}$ ) and 4) with undersampling and with T2 correction (named  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$ ). The undersampling of the data was defined with  $t=n*t_e$  with  $t_e = 1/(2*(4.7-1.3)*B_0* /2\pi)$  and  $n=32$ , while for full sampling  $t_e=1/BW$  with  $BW$  being the spectral bandwidth used in the acquisition. We also studied the effect on TG parameter estimation of transversal decay correction. Without correction, we considered a single  $T2^*$  as a free parameter, i.e., all  $T2_k$  and  $T2_w$  were equal and the TE weighting was not taken into account, that is to say that TE was set to 0. All these versions were integrated in homemade software written in MATLAB.

### [M<sub>peak</sub> quantification approach](#)

The second quantification approach ( $M_{peak}$ ) studied fits the lipid resonance peaks and the lipid composition is deduced after quantification from the relations given in table 2.1. The quantification approach is based on a Voigt fitting method (Ratiney et al. 2008), which is close to the AMARES (Leentje Vanhamme, van den Boogaart, and Van Huffel 1997) method, by fitting either pure Lorentzian lines, pure Gaussian lines or a mixture of the two (Voigt lines). The model function used is described by:

$$f(t) = e^{i\varphi_0} \sum_{k=1}^9 c_k e^{\alpha_k t + (\beta_k t)^2 + i2\pi f_k t} \quad [2]$$

where  $\varphi_0$  is the zero-order phase,  $c_k$  the amplitudes,  $\alpha_k$  the Lorentzian damping factors,  $\beta_k$  the Gaussian damping factors and  $f_k$  the frequency of the  $k^{\text{th}}$  proton group.

The algorithm implementing  $M_{peak}$  (Ratiney et al. 2008) uses multiple random starting values for the frequency and damping factor parameters to compute, using linear least squares, the starting values of the amplitude and zero-order phase parameters as in AMARES. Then a nonlinear least squares algorithm (trust-region reflective algorithm in MATLAB) is employed to fit the global model function given in [2]. To take into account the T2 weighting

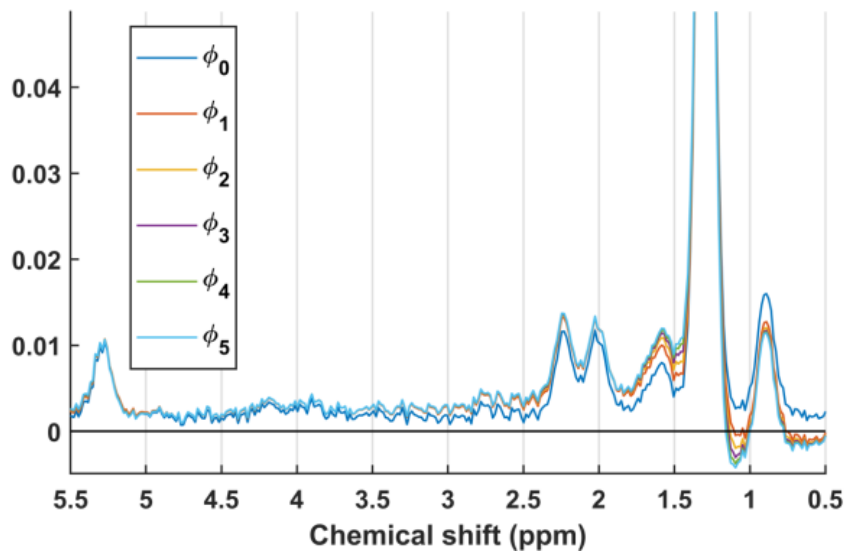
on the peak amplitude, due to the localized MR spectroscopy sequence employed, the  $c_k$  parameters were multiplied by  $\exp(\text{TE}/T_{2k})$ , with estimated  $T_{2k}$ .

LCModel (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada), with the control parameter SPTYPE set to Lipid-8 (as described in the LCModel user's manual) was also used on experimental data (described below) only. For lipid signals, this quantification method fits a flexible combination of Gaussian and Lorentzian line shapes to the lipid resonances (Coum, Ouldamer, et al. 2016), but the exact model function used and the implementation details are unknown. As a result, the analysis of the Monte Carlo in light of the model function and implementation used, as performed for  $M_{\text{peak}}$  and  $M_{\text{TG\_param}}$  approaches, was not allowed.

### 2.2.2.2. *Simulated data and Monte Carlo studies*

To compare the different quantification approaches (the four implementations with  $M_{\text{TG\_param}}$  and  $M_{\text{peak}}$ ), their statistical performance was assessed using simulated signals through Monte Carlo studies. The two models were also compared within the Information Theory framework (known as identifiability analysis), which will be referred to as the theoretical results, with details and results given in the Appendix. The fatty acid composition of human subcutaneous abdominal adipose tissue published by Garaulet et al. (Garaulet et al. 2006) was used as a reference in the simulated data. The targeted composition was set to 18% PUFA<sub>indx</sub>, 54.6% MUFA<sub>indx</sub> and 27.4% SFA<sub>indx</sub>, corresponding to  $ndb^{\text{target}} = 2.7$  and  $nmidb^{\text{target}} = 0.54$ , note that in this case  $nmidb/ndb^2 = 0.074$  which was different from the relationship assumed in the fitting. The PDFF was set to 97%, corresponding to  $A_w = 1$  and  $A_f = 37$ . Four sets of Monte Carlo simulations were performed using the ten-peak signal (nine peaks for lipid and one peak for water) whose peak amplitudes are related to the fatty composition (see table 2.1 and table 2.3 in the Appendix). For each Monte Carlo study, a gold standard signal was designed with the target TG parameter variables and 100 Gaussian noise realizations with zero mean and a variance determined according to the desired signal-to-noise ratio (SNR) (varying from 60 to 300 in increments of 60) were randomly generated and added. Since several effects or imperfections, such as Voigt line shape, different  $T_2$ s, or phase distortions are encountered in real acquisition, the gold standard signal was gradually complicated in the Monte Carlo studies. In the first one, the simulated signal had a simplified behavior. Indeed, all the  $T_{2k}$  were assumed to be the same for all peaks resulting in a common Lorentzian damping factor ( $\alpha$ ) for each peak, set to  $1/T_2^*$  with  $T_2^*$  set to 22.4 ms and a null Gaussian damping factor ( $\beta$ ). In the second set, the peak amplitudes were multiplied by  $\exp(-$

TE/T<sub>2k</sub>) with TE = 14 ms and T<sub>2k</sub> = 65 ms, and the signal was damped by a common Lorentzian damping factor  $\alpha$  (which equals 1/T<sub>2k</sub>), and a common Gaussian damping factor  $\beta$  at 27.29Hz (T<sub>2</sub>' = 22 ms  $\beta = \sqrt{\frac{1}{4 \cdot \log(2) \cdot T_2' \cdot T_2'}}$ ) and a zero-order phase set to 0. The third set of Monte Carlo simulations was performed with the same definition of parameters except that each peak had a different T<sub>2</sub> (T<sub>21</sub> = 47.3 ms, T<sub>22</sub> = 30.5 ms, T<sub>22b</sub> = 34.3 ms, T<sub>23</sub> = 45.0 ms, T<sub>24</sub> = 41.8 ms, T<sub>25</sub> = 35.8 ms, T<sub>26</sub> = 29.0 ms, T<sub>27</sub> = 83.0 ms, T<sub>28</sub> = 54.7 ms, T<sub>2w</sub> = 300 ms). For the fourth and last set, the same settings as for the third set were used, with a SNR similar to the one encountered *in vivo*, i.e., 210. Additionally, phase distortions were introduced to simulate the effect of eddy currents, as illustrated in figure 2.1. Finally, the absolute error mapping of *ndb* and *nmidb* was computed using the same settings as used in the third set and by varying the *ndb*<sup>target</sup> and *nmidb*<sup>target</sup> values (from 0 to 6 for *ndb* and from 0 to 3 for *nmidb*). In the following, the estimated TG parameters deduced from the M<sub>peak</sub> approach or fitted by the M<sub>TG\_param</sub> approaches will be indicated with the superscript <sup>est</sup>.



**Figure 2.1** : Simulated adipose tissue lipid MR spectra used in the Monte Carlo studies, with different degrees of baseline distortion, simulating the eddy current effect; SNR = 210. The phase variation was simulated using the following exponential model:  $\phi_i(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$ ,  $\tau_i = \frac{50+50 \cdot i}{3}$  ms for  $0 \leq t \leq 100$ ms, with  $i=0 \dots 5$ , for the 6 spectra above.

### 2.2.2.3. *In vitro* and *in vivo* data

Eight edible oils were used for *in vitro* data. Their compositions were characterized by gas chromatography (details in supplementary information) performed by Fonctionnal Lipidomics platform of INSA and given as a pair of values (*ndb*, *nmidb*): avocado (2.58, 0.21),

canola (3.35, 0.63), hazelnut (2.92, 0.23), walnut (4.35, 1.73), olive (2.60, 0.17), pistachio (3.11, 0.59), grape-seed (3.89, 1.37) and sesame (3.17, 0.78). *In vitro* MRS signals were acquired on a preclinical 4.7T BioSpec Bruker system, using a PRESS sequence with TR = 5000 ms, TE = 14.1 ms, VOI of 4×4×4 mm<sup>3</sup>, one signal average and 4-kHz bandwidth, 4096 data points, without outer-volume saturation. The oil vials were 15 mm in diameter and 930 mm long. The 4×4×4-mm<sup>3</sup> VOI was positioned in the center of the bottle. A large bandwidth of the exciting pulse was used to reduce the effect of the chemical shift artifact (5400 Hz for first pulse and 6840 Hz for the second and third pulses of the PRESS sequence).

Nine volunteers underwent a STEAM sequence, using respiratory triggering, on a Philips Ingenia 3T system with the following parameters: TR = 3000 ms, multiple TE = n\*10+4 ms where n was an integer ranging from 1 to 6, TM = 16 ms, 20×20×20-mm<sup>3</sup> VOI, four signal averages, 2048-Hz bandwidth and 1024 data points. The single voxel was located in the posterior left part of the abdominal subcutaneous adipose tissue at the level of the L4 vertebra. The MR spectrum was acquired twice in a row to perform a test and retest and to measure the repeatability of the quantification approaches. No water suppression was used. The phase of the signal of the first echo (TE<sub>1</sub> = 14 ms) was corrected with the phase of the second echo (TE<sub>2</sub> = 24 ms), which was less impacted by eddy current effects. This correction was considered possible because 1) the methylene (CH<sub>2n</sub>) amplitude peak was the single preponderant component and 2) ΔTE=TE<sub>2</sub>-TE<sub>1</sub> was small compared to the lipid T2 and 1/J, where the J scalar coupling constants were between 4 and 8 Hz for *in vivo* fatty acid spectrum. The quantification methods were applied only on the spectrum of the first echo; the other echoes were acquired to estimate the T2s of each resonance peak.

For *in vitro* and *in vivo* data, no T1 relaxation correction was required, because the T1 relaxation times were much shorter than TR (Brix et al. 1993). The SNR was calculated in the time domain as the ratio between the absolute amplitude of the real part of the first point and the standard deviation of the noise calculated with the 150 last points of the signal.

#### 2.2.2.4. *T<sub>2k</sub> estimation*

For *in vivo* data, apparent T<sub>2k</sub> estimation was made in the frequency domain, for each resonance, with a nonlinear least squares estimation of the monoexponential  $S_k(TE) = S_{0k} \cdot \exp(-TE/T_{2k})$ , where  $S_k(TE)$  was the measured integrals of the k<sup>th</sup> peak at TE (six echoes varying regularly from 14 ms to 64 ms),  $S_{0k}$  the amplitude at TE=0 and T<sub>2k</sub> the T2 of the k<sup>th</sup> peak. This nonlinear regression was performed using the MATLAB lsqcurvefit function. The

starting values that were used in the fitting were defined using the results of a linear fitting with the equation  $\log(S_k(TE)) = \log(S0_k) * (-TE/T2_k)$ . For *in vitro* data, the  $T2_k$  were set at  $T2_1=40.8$  ms,  $T2_2=17.5$  ms,  $T2_3=48.6$  ms,  $T2_4=27.7$  ms,  $T2_5=34.0$  ms,  $T2_6=17.6$  ms,  $T2_7=49$  ms,  $T2_8=37.9$  ms (Ramamonjisoa et al. 2013).

### 2.2.2.5. Comparison of the quantification results

For the Monte Carlo studies, the quantification results were compared to the theoretical parameter values used to generate the signal and biases, and the variabilities on the TG parameter estimations were assessed and compared. For the oil acquisitions, the quantification results were compared according to their concordance to the known oil composition. For the SAT *in vivo* acquisitions, for each index or parameter of interest and each subject, a percent difference was calculated as the ratio between the absolute difference between the two estimations and the mean of these two estimations. The variability percentage (*Var*) of the test-retest was then the average of these percent differences computed on the nine subjects (n=9):

$$Var = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^N \frac{|test_i - retest_i|}{(test_i + retest_i)/2} * 100\%$$

where  $test_i$  and  $retest_i$  are the estimation and second estimation, respectively, of one of the parameters of interest ( $ndb$ ,  $nmidb$ ,  $MUFAidx$ ,  $PUFAidx$ ,  $SFAidx$ ). For each index or parameter of interest, the average of the two estimations was then compared to the fatty acid composition found in the literature (Garaulet et al. 2006; Hodson, Skeaff, and Fielding 2008; Field, Angel, and Clandinin 1985).

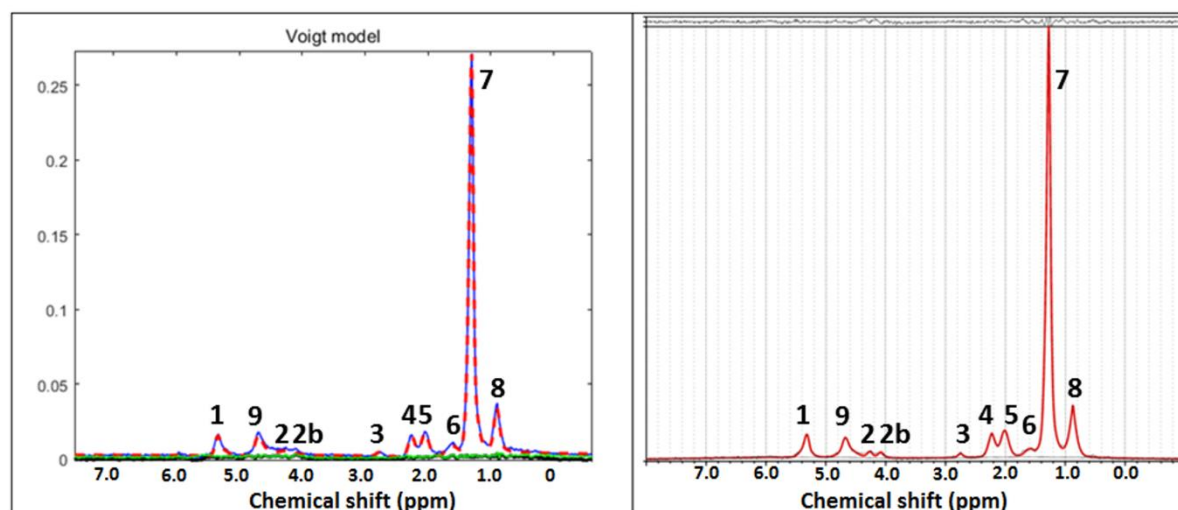
*In vivo* spectra before and after eddy current correction and *in vitro* spectra were also quantified with LCModel, for comparison with  $M_{TG\_param}$  quantification versions and  $M_{peak}$  quantification on the experimental data.

## 2.2.3. Results

### 2.2.3.1. Visual fitting results vs quantitative results

Figure 2.2 shows the fitting results of two different methods (LCModel and  $M_{peak}$ ) applied on the same *in vivo* spectrum. In both cases, the residual signal (i.e., the difference between the fitted spectrum and the original spectrum) appears to be very small and similar, but the quantitative results differ noticeably between the two methods (3.8%  $PUFAidx$ , 43%

MUFAindx and 53.6% SFAindx with the Voigt model and 9.6% PUFAindx, 50% MUFAindx and 40.5% SFAindx with LCMModel), hence the need to quantify the methods to be studied in terms of their statistical performance (bias and variance on the parameter estimation) and their sources of instability or error.



**Figure 2.2:** *In vivo* MRS was fitted with two models: Mpeak (Voigt model) on the left and LCMModel on the right. For both models, the fitted curve is represented by a red line. For the left spectrum the original spectrum is represented with a blue line, the residual is a black line and the absolute residual is a green line on the same window. For the right spectrum, the residual is represented with a black line in a separate window just above the spectrum. Different peaks are noted as well: 1, olefinic (-CH=CH-); 2 and 2b, glycerol (-CH<sub>2</sub>-O-CO-); 3, dyacil (-C=C-CH<sub>2</sub>-C=C-); 4,  $\alpha$ -carboxyl (-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 5,  $\alpha$ -olefinic (-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-); 6,  $\beta$ -carboxyl (-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 7, methylene (-CH<sub>2</sub>-); 8, methyl (-CH<sub>3</sub>). For this example, even if the residual is very small the fatty acid compositions found with the two models are clearly different (3.8% PUFA, 43% MUFA and 53.6% SFA with the Voigt model and 9.6% PUFA, 50% MUFA and 40.5% SFA with LCMModel).

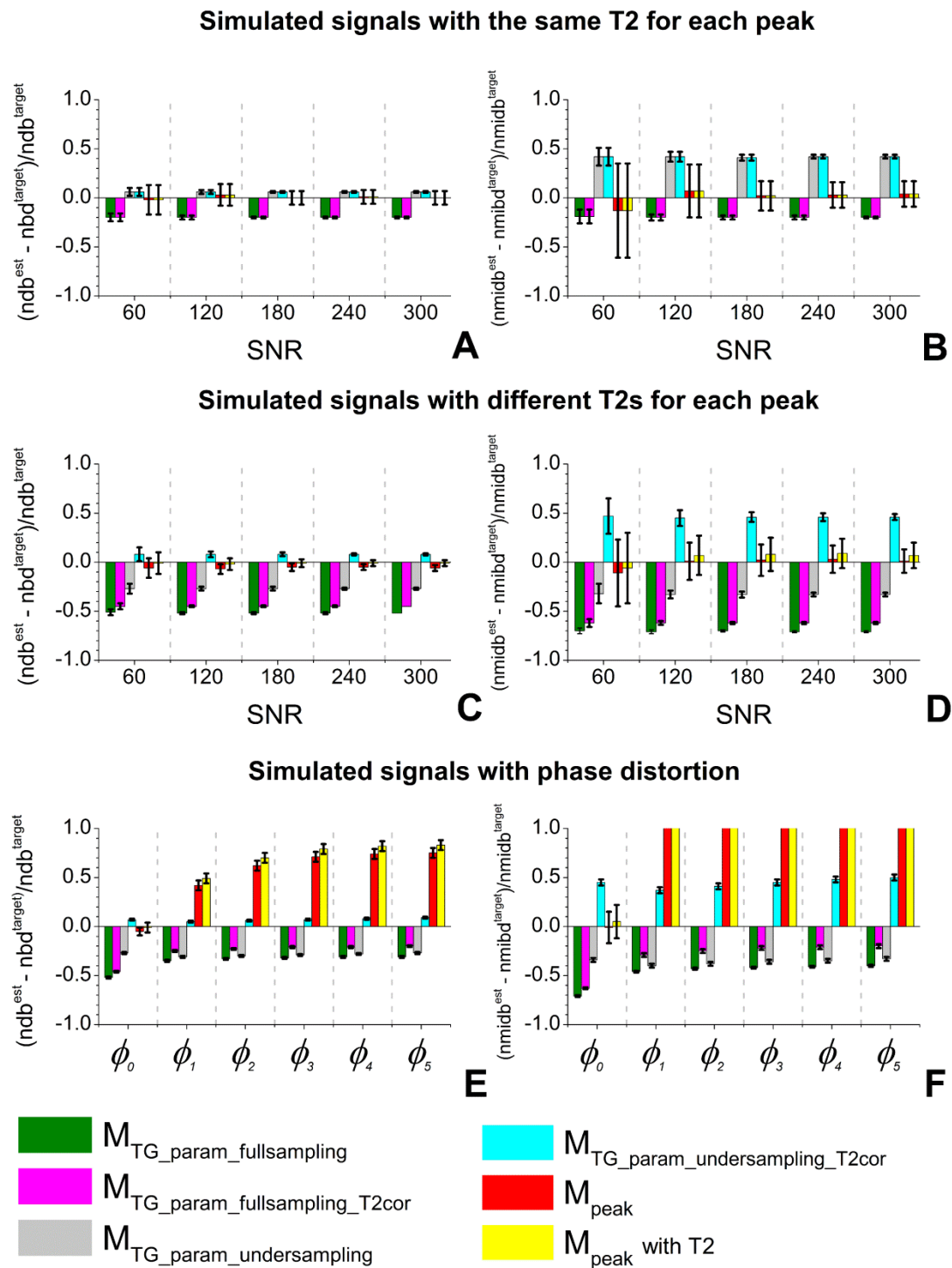
### 2.2.3.2. Results of the Monte Carlo studies

The results of the first Monte Carlo study, which mimicked *in vivo* acquisitions, were consistent with the identifiability analysis given in the Appendix. The standard deviation (SD) of the relative difference between the estimated value and the target value (which is proportional to the percentage root mean square error) was compared with the theoretical uncertainty (based on the Cramér Rao Lower Bounds computation) derived from quantification approaches including subprocessing. Regarding *ndb*, the SD was 1.04% for the  $M_{TG\_param\_fullsampling}$ , 1.46% for  $M_{TG\_param\_undersampling}$  and 13.79% for the  $M_{peak}$ . These values were slightly higher than the uncertainties computed in the identifiability analysis (table 2.4 in the Appendix) – 0.9% for the  $M_{TG\_param\_fullsampling}$ , 1.35% for the  $M_{TG\_param\_undersampling}$  and 4.89% for the  $M_{peak}$  – but they showed the same trend. The same observation was made for the SD of *nmidb*: 2.51% for the  $M_{TG\_param\_fullsampling}$ , 4.51% for the  $M_{TG\_param\_undersampling}$  and

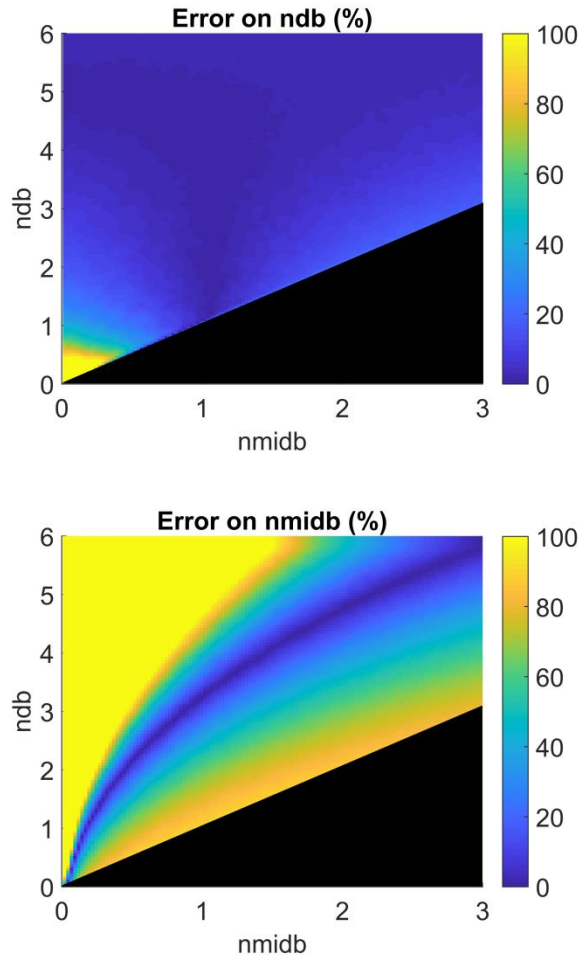


21.45% for the  $M_{\text{peak}}$  compared to the theoretical uncertainties of 1.61%, 2.45% and 18.98%, respectively. We observed the same tendency for the other Monte Carlo simulations.

In the second Monte Carlo study (figure 2.3A, B), the results using the  $M_{\text{TG\_param}}$  showed the best results with the smallest variability but had a bias of  $-6.34 \pm 0.11\%$  for  $ndb$  (respectively,  $42.05 \pm 0.35\%$  for  $nmidb$ ) for the undersampling and a bias of  $-20.28 \pm 0.08\%$  (respectively,  $-20.18 \pm 0.17\%$  for  $nmidb$ ) for the full sampling. The  $M_{\text{peak}}$  quantification provided the lowest biased estimations (bias of  $0.72 \pm 0.78\%$  for  $ndb$  and  $-0.78 \pm 4.77\%$  for  $nmidb$ ) but with higher variability. Here, as one can expect, when all peaks have the same T2 relaxation times, the introduction of T2 as *a priori* knowledge in the  $M_{\text{TG\_param}}$  quantification has no effect on the estimation. On the contrary, when the simulated data have different T2 values for each peak as in the third Monte Carlo study (figure 2.3C, D), the introduction of T2 *a priori* knowledge in the  $M_{\text{TG\_param}}$  approach reduces the absolute bias for both undersampling and full sampling. In the last Monte Carlo study (figure 2.3E, F), the fitting using the  $M_{\text{peak}}$  approach was greatly influenced by the distortion of the baseline, unlike the  $M_{\text{TG\_param}}$ . The estimation of  $nmidb$  was the most influenced, with a bias of up to 400%. When all lipid peaks had different T2s, the  $M_{\text{TG\_param}}$  quantification with undersampling and T2 correction had the smallest variability but some biased estimated values. This bias could also be influenced by the assumed relation between  $ndb$  and  $nmidb$ , here  $nmidb = 0.093 * ndb^2$  while the ones used in the simulation are different. Besides the pair of values –  $ndb$  and  $nmidb$  – which moved off this relation showed larger biases, especially for the estimation of  $nmidb$  (see figure 2.4).



**Figure 2.3:** Monte Carlo simulation results. The simulated signal was composed with  $ndb^{target} = 2.7$  and  $nmldb^{target} = 0.54$ , and a PDF of 97%. These parameters should model a spectrum close to the *in vivo* spectrum. Bar plots showing the mean  $\pm$  SD of the difference as a percentage between the estimated value (est) by different quantification methods and the target value (target) of ndb (A,C,E) or nmldb (B,D,F). The results are obtained from 100 random draws of noise added to simulated signals with the same T2 for each peak (A, B), with different T2s for each peak (C, D) with a phase distortion (E, F).

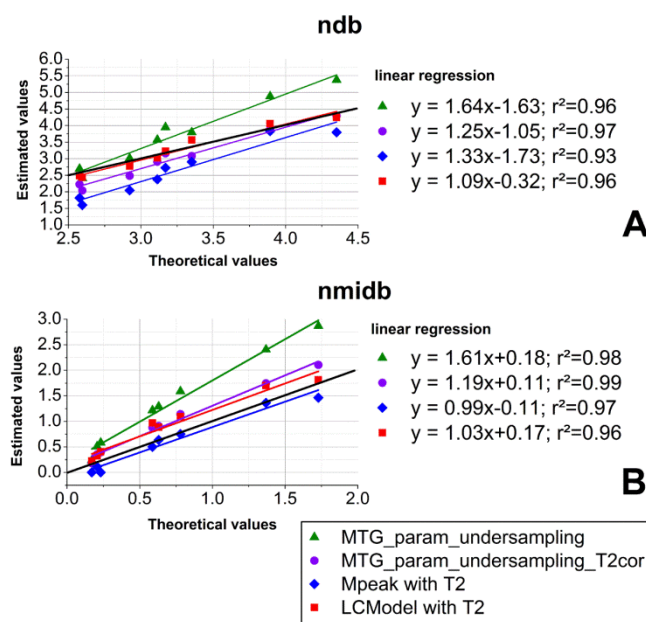


**Figure 2.4: Absolute quantification errors on  $ndb$  and  $nmldb$  according to the FA composition for the  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  with undersampling and T2 correction. The black area has no physical meaning ( $nmldb > ndb$ ) and has not been evaluated. The error varies according to FA composition. The part with  $nmldb$  varying from 0.30 to 0.80 and  $ndb$  varying from 1.90 to 2.80 correspond to the expected *in vivo* values.**

### 2.2.3.3. *In vitro* results

The mean SNR for *in vitro* data was 2062 (range, 1769–2360). In the particular case of *in vitro* data, where the MR spectroscopic signal show high SNR and good spectral resolution in the implementation of  $M_{TG\_param}$ , the constraint link  $ndb$  and  $nmldb$  has not been used as the relationship ( $nmldb = 0.093 * ndb^2$ ) was not found for all oils in the results from gas chromatography. In the present case,  $nmldb$  was freely fitted in the last step, which enabled to improve the accuracy of  $M_{TG\_param}$  approach results. Figure 2.5 shows the oil quantification results taking the composition characterized by gas chromatography as the gold standard reference. For each quantification approach studied, estimated values correlated well with the theoretical values (with a coefficient of determination  $r^2$  close to 1). However,  $M_{peak}$  quantification slightly underestimated  $ndb$  and  $M_{TG\_param\_undersampling}$  overestimated it. The

$M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  (with *a priori* knowledge on T2s included in the model) gave good estimation of *ndb*, as well as LCMoel. For *nmidb*, Mpeak gave the best estimation,  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  and LCMoel slightly overestimated *nmidb*. In the range of expected *in vivo nmidb* (0.30–1.0), LCMoel and  $M_{TG\_param\_undersampling}$  seemed to give a good estimation of the *nmidb* value.



**Figure 2.5:** Estimated values as a function of theoretical values for *ndb* (A) and *nmidb* (B) from *in vitro* MRS acquired with a PRESS at 4.7T on eight vegetable oils (avocado, canola, hazelnut, walnut, pistachio, grape-seed, sesame and olive). Black line represents the  $y=x$  relation.  $M_{peak-Voigt}$  (in blue), LCMoel (in red),  $M_{TG\_param\_undersampling}$  (in green) and  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  (undersampling with T2 correction, in purple) show a good correlation between estimated values and theoretical values. LCMoel estimated *ndb* values in closer agreement with the theoretical values. Voigt model gave the best estimation of *nmidb* but underestimated *ndb* values. LCMoel and  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  gave consistent values of *ndb* and *nmidb*.

#### 2.2.3.4. *In vivo* results

The nine male volunteers, aged  $26.1 \pm 6.3$  years, had a BMI of  $24.8 \pm 1.4$  kg/m<sup>2</sup>. The SNR of the MR spectra varied between 203 and 314. Of the 18 acquisitions (test and retest acquisitions together) the mean and the standard deviation of T2<sub>k</sub> were the following: T2<sub>1</sub> =  $47.3 \pm 3.0$  ms, T2<sub>2</sub> =  $30.5 \pm 2.3$  ms, T2<sub>2b</sub> =  $34.3 \pm 2.4$  ms, T2<sub>3</sub> =  $45.0 \pm 17.1$  ms, T2<sub>4</sub> =  $41.8 \pm 4.6$  ms, T2<sub>5</sub> =  $35.8 \pm 1.7$  ms, T2<sub>7</sub> =  $83.0 \pm 2.4$  ms, T2<sub>8</sub> =  $54.7 \pm 6.1$  ms. T2<sub>6</sub> was not estimated because the peak at 1.6 ppm was indistinguishable from the peak at 1.3 ppm. T2<sub>k</sub> values were used in the  $M_{TG\_param}$  quantification to correct estimated amplitudes of the  $M_{peak}$  and LCMoel quantification.

For the *in vivo* results (table 2.2), the test-retest variability was the smallest for the  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$ . Note that, in the implementation, the relationship linking *ndb* and *nmidb* enabled the  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  fitting approach to reduce the test-retest variability on *in vivo* spectra (22.3% vs 4.1% for *nmidb* estimation and 7.3% vs 2.0% for *ndb* estimation). This model (using or not the *ndb*-*nmidb* connection) seemed to give values close to the literature values taken as reference. LCMoel showed good test-retest variability-similar to the one obtained with  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  and a *ndb*-*nmidb* connection in its implementation but with different estimated parameter values.

**Table 2.2:** For *in vivo* measurements, test-retest variability was calculated.  $M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$  seemed to have the best results with the least variability and estimated values close to the theoretical values. \* PUFA<sub>indx</sub>, MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub> values estimated using *ndb* and *nmidb* values. \*\*in the original paper, the polyunsaturated index (PUI) and unsaturated index (UI) were used and corresponded to  $ndb = 9/2 \times UI$  and  $nmidb = 9/2 \times PUI$

	Test-retest variability				
	ndb	nmidb	PUFA <sub>indx</sub>	MUFA <sub>indx</sub>	SFA <sub>indx</sub>
$M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$	2.0 %	4.1 %	4.1 %	0.9 %	3.6 %
$M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$ (without constraints on <i>ndb</i> - <i>nmidb</i> relationship)	7.3 %	22.3 %	22.3 %	8.7 %	16.8 %
$M_{peak}$	12.5 %	98.1 %	98.1 %	11.6 %	12.7 %
LCMoel	2.7 %	7.6 %	7.6 %	7.8 %	3.0 %
	Mean ± SD estimated values				
	ndb	nmidb	PUFA <sub>indx</sub>	MUFA <sub>indx</sub>	SFA <sub>indx</sub>
$M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$	2.52 ± 0.23	0.60 ± 0.11	19.9 ± 3.7*	44.3 ± 0.5*	35.8 ± 4.0*
$M_{TG\_param\_undersampling\_T2cor}$ (without constraints on <i>ndb</i> - <i>nmidb</i> relationship)	2.92 ± 0.26	0.65 ± 0.15	21.6 ± 5.1*	54.2 ± 8.5*	24.2 ± 6.8*
$M_{peak}$	1.39 ± 0.29	0.01 ± 0.02	0.3 ± 0.5*	46.2 ± 9.6*	53.5 ± 9.6*
LCMoel	1.58 ± 0.17	0.35 ± 0.04	11.6 ± 1.3*	30.0 ± 5.6*	58.4 ± 5.5*
Gas chromatography	Values from the literature				
	ndb	nmidb	PUFA	MUFA	SFA
(Garaulet et al. 2006)	2.81	0.63	18.0	54.6	27.4
(Hodson, Skeaff, and	2.60	0.50	16.5	54.0	29.5

Fielding 2008)

(Field, Angel, and Clandinin 1985)	2.76	0.45	14.4 ± 2.7	57.5 ± 3.1	26.0 ± 3.0
<b>MRS</b>	<b>ndb</b>	<b>nmidb</b>	<b>PUFA<sub>indx</sub></b>	<b>MUFA<sub>indx</sub></b>	<b>SFA<sub>indx</sub></b>
(Hamilton et al. 2017)	2.83 ± 0.20	0.74 ± 0.15	24.6*	54.1*	30.3*
(Machann et al. 2017)	2.67**	0.49**	27*	40*	33*

LCModel was applied on the spectrum at the first TE and the results were compared with and without phase correction. The mean estimated values of *ndb*, *nmidb*, PUFA<sub>indx</sub>, MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub> were equivalent in both cases: the values without correction were equal to 1.49 ± 0.18, 0.39 ± 0.08, 13.0 ± 2.6%, 23.6 ± 9.5%, 63.4 ± 7.5%, respectively, compared to the values in table 2.2. However, the test-retest variability percentage was better with the phase correction than without this correction: 2.0% vs 4.5% for *ndb*, 7.6% vs 15.2% for *nmidb*, 7.6% vs 15.2% for PUFA<sub>indx</sub>, 4.7% vs 12.5% for MUFA<sub>indx</sub> and 4.0% vs 8.3% for SFA<sub>indx</sub>.

## 2.2.4. Discussion

Lipid MRS is a simple and fast tool to analyze metabolic modification when quantifying fatty acid: it could be advantageous in the follow-up of the lipid composition modification in adipose tissues in weight gain or weight loss phases, in the evaluation of fat surrounding a tumor or in inflammatory tissue (Coum, Ouldamer, et al. 2016; Dorez et al. 2017). However, the fatty composition modifications could be very small in comparison to the measurement uncertainties related to the current methods. Moreover, as often encountered in quantitative MRI or MRS, validation of the quantification method taking into account the reproducibility on different imaging systems from different manufacturers is a major problem. This paper has demonstrated that, in the particular case of *in vivo* lipid signal analysis, the M<sub>TG\_param</sub> approach could be a solution to be considered for fatty acid composition assessment as this fitting solution appears to be robust to *in vivo* conditions .

The M<sub>TG\_param</sub> quantification approach, where there is a linear relationship between the estimated parameters and the proportion of fatty acid types to be determined, has been qualified as a direct estimation method. With this approach, the relative error in the estimation of fatty acid composition would be the same as that of the estimated parameter (e.g., *nmidb*

with PUFAindx) or the sum of parameter errors (e.g., MUFAindx and SFAindx). In the  $M_{\text{peak}}$  approach, the fatty acid composition is determined by ratios of peak amplitudes (Zancanaro et al. 1994; Ren et al. 2008; Strobel, Hoff, and Pietzsch 2008; Corbin et al. 2009), which is qualified as an indirect determination. In this case, small errors on the estimation of two peak amplitudes would increase errors and therefore result in greater variability of the results.

The variability of the results could be anticipated by experimental design, by studying the properties of the model function employed (calculating the condition number of the Jacobian matrix) as well as the theoretical uncertainties, as described in the Appendix. A too large condition number expresses an ill-conditioned problem and the parameters to estimate cannot be solely determined from the signal acquired, as for the  $M_{\text{peak}}$  approach, which also showed higher theoretical uncertainties than the  $M_{\text{TG\_param}}$  approach. The same observations were made in the Monte Carlo studies for the variability of the different approaches. The test-retest variabilities obtained with the *in vivo* data also corroborate these assessments and allow saying that  $M_{\text{TG\_param}}$  provides robust with small test-retest variability percentage estimates. This small variability percentage is mainly due to the relationship linking *ndb* and *nmidb* with a quadratic function which narrows the scope of the solutions while letting some latitude in the fit results. If no constraints or relationship are imposed, *ndb* and *nmidb* are correlated and higher variability is found. .

As a result, in the particular case of adipose tissue, *in vivo* MRS lipid quantification, the model function simplification used in the  $M_{\text{TG\_param}}$  appears to be a key leverage point to increase the precision of the result, at the expense of a possible bias.

### [Bias considerations](#)

Reducing the number of parameters enabled us to decrease the variability of the results but this might have induced a bias in estimating the fatty acid composition. We investigated several sources of error and several implementations of  $M_{\text{TG\_param}}$  that could bias the estimations. With the Monte Carlo studies, biases on *ndb* and especially *nmidb* estimations were observed because the relationship between *ndb* and *nmidb* assumed in the fitting algorithm was not checked in the parameters used to simulate the signal. This mismatch was implemented on purpose to underline the importance of the assumption linking *ndb* and *nmidb* in the  $M_{\text{TG\_param}}$  approach, which participates in the robustness of the method but also constitutes a limitation of the method. Biased estimations could also occur if lipid multi-peak T2 weightings are simplified to a single lipid T2 in the fitting model. When different T2 weightings were used for the different lipid peaks involved in the TG parameter variables (as

was case on *in vivo* data), their inclusion in the computation process appeared to be important to avoid bias in estimating the fatty acid composition. For LCMoel and  $M_{\text{peak}}$ , the amplitudes need correcting by the factor  $\exp(TE/T2_k)$  prior to estimating the fatty acid composition, as emphasized earlier (Strobel, Hoff, and Pietzsch 2008; Ren et al. 2008). Of course, the correction is unnecessary if the two resonance peaks used in the *ndb* or *nmidb* relation have the same T2 relaxation time. For  $M_{\text{TG\_param}}$ , the  $T2_k$  correction needs to be included in the model and  $T2_{kS}$  need to be estimated before. Note that the contribution of glycerol (5.19 ppm) was considered to be part of the olefinic contribution (5.29 ppm) because these two peaks were too close to be distinguished. Therefore, we considered that the two peaks had the same T2 relaxation time. Considering that T2 weighting can bias the estimations of the fatty acid composition, it could be advantageous to use an ultra-short echo time sequence (Gajdošík et al. 2015). It should also be noted that the PUFA<sub>indx</sub> calculation, here made from *nmidb*, was not an absolute quantification but a coherent index of polyunsaturation, in contrast to the other types of fatty acid. Using this calculation, the maximum possible proportion of PUFA is calculated. When the most frequently identified PUFA was di-unsaturated fatty acid, this PUFA<sub>indx</sub> calculation led to consistent results. On the other hand, it could be possible to quantify the proportion of PUFA more precisely by calculating the proportion of  $\omega$ -3 (Lundbom et al. 2009; Fallone, McKay, and Yahya 2018) and correcting the present calculation.

In this case, the effect of T2 weighting will have to be considered. In this study, we focused on the quantification of fatty acids where lipids were largely predominant (PDFFF ~ 95% in oil and in adipose tissue). In fat/water mixtures, Peterson et al. (Peterson, Svensson, and Månsson 2014) showed that the most critical point to achieve a reduction of errors for the quantitative imaging method was to correctly estimate the T2 of water and the 1.3-ppm peak. This would also be true for the  $M_{\text{TG\_param}}$  approach.

In the case of fat liver quantification, Hamilton et al. (2009) showed that the fatty acid quantification results depend on the  $^1\text{H}$  MRS sequence used to collect data. Fat peak areas normalized by the water peak were consistently greater on PRESS than on STEAM and the relative amplitudes of the methyl and methylene peaks were found different in STEAM compared to PRESS due to different apparent T2 correction. Note that these considerations also depend on the quantification method used (in this case AMARES). Consequently, Hamilton et al. (2017) used the STEAM sequence, with mixing time and echo time optimized to minimize J-coupling effect, to estimate the adipose tissue fatty acid composition. In the



present *in vitro* study, estimations of  $n_{db}$  and  $n_{midb}$ , corrected with T2 values, were close to the theoretical values for all the fitting approaches, which suggests that fatty acid composition can also be estimated using the PRESS sequence. It has also been demonstrated that PRESS or STEAM can yield consistent fatty acid composition by using long echo time ( $\sim 120$  ms for STEAM and  $\sim 180$  ms for PRESS)(Fallone, McKay, and Yahya 2018). In this latter case, the optimized echo time for each sequence has been experimentally defined at 3T to match high resolution NMR measurements. The undersampling used in the  $M_{TG\_param\_undersampling}$  method focused the analysis on the methylene peak time domain evolution. For this method, the importance of taking into account the spectral pattern due to J-coupling modulation is less critical.

The time domain quantification approach can go back and forth between the full sampling (enabling the spectrum to be inspected after Fourier transform) and the constrained sampling achieved in MGE-MRI. On simulated data with different T2s for each peak, it was demonstrated that the  $M_{TG\_param}$  using a regular undersampling reduced bias. Undersampling was also found to reduce bias 1) when the parameterized model function had pure Lorentzian damping factors while the data to adjust had a Voigt line shape (i.e., a mixture of Gaussian and Lorentzian damping factors) and 2) when the data presented phase distortions. Note that undersampling was made possible in  $M_{TG\_param}$  because the number of parameters to estimate was reduced. The undersampling method used in this paper concentrated the least squares minimization on data samples with a good SNR, as the frequency sampling was set on the methylene peak frequency. Moreover, since it resulted in fewer data samples in the minimization procedure, the estimates are less influenced by the mismatch of the exponentially decaying envelop between the model and the original data.

Undersampling also reduces the processing time. For example, in this study, on the *in vivo* spectrum the  $M_{TG\_param\_undersampling}$  had a processing time of around 10 s versus 25 s for  $M_{TG\_param\_fullsampling}$  and versus 80 s for our implementation of  $M_{peak}$ . The time domain fitting approach could also be useful in future investigations for irregular sampling of the acquisition(Merhej et al. 2014; Karkouri et al. 2017).

Validating a quantification strategy is a difficult task. The methodology proposed to study and validate different quantification strategies has limitations inherent to the use of simulated/*in vitro*/*in vivo* data. Monte Carlo simulation analysis is always biased because the model and variations studied are necessarily only an approximation and simplification of real-life data. Nevertheless, Monte Carlo simulation analysis has the advantage of studying

possible sources of error separating those leading to variability and increased uncertainties from those resulting in systematic under- or overestimation (bias). The *in vitro* validation also shows limitations for the validation of a quantification strategy that aimed to accurately fit *in vivo* acquired data. Indeed, *in vitro* acquisitions show a different spectral pattern from *in vivo* acquisitions due to different homogeneity field conditions. As a result, the line shape is different from *in vivo* spectra and the resonating groups depict multiplets that are better spectrally resolved. Nevertheless, this work shows that the standard MRS method ( $M_{\text{peak}}$  and LCmodel) lead to valuable results on *in vitro* oil acquisitions. Validation of the *in vivo* results is also a difficult task: a strict gold standard could be a countermeasure provided, for example, by gas chromatography analysis (Ramamonjisoa et al. 2013). This technique should be performed with selective analysis of major classes of lipids (triglyceride, phospholipid, cholesterol) so that it can be easily compared to MRS measurements. However, this technique requires biopsies, which can be unjustified from an ethical point of view when working, as here, on human volunteers. Gas chromatography analysis would be feasible in the context of future animal studies. To validate these results, we opted for a repeatability assessment (with a test-retest approach) and for a likelihood assessment by comparing the estimated lipid composition with Garaulet et al. (Garaulet et al. 2006), Hodson et al. (Hodson, Skeaff, and Fielding 2008) and Field et al. (Field, Angel, and Clandinin 1985).

Quantification results obtained with LCModel software, widely used in the *in vivo* MRS community (Coum, Ouldamer, et al. 2016; Coum, Noury, et al. 2016), were included. The results obtained by LCModel seem to present good *in vitro* and *in vivo* properties, with good repeatability, providing a seemingly plausible fatty acid composition. By looking at the LCModel results and fits, it is most probable that the LCModel quantification strategy employed regularization to handle small baseline variations (due to a possible eddy current effect at short echo times or short first-order phases). In our view, this regularization should have been done in a specific way, i.e., based on prior knowledge of the relative peak amplitudes, but the exact implementation of this is unknown.

It should be noted that what matters most in the quantification process is the correct (i.e., with the least variability and least bias) estimation of peak amplitude parameters. However, a strong interdependence exists in the estimation of the peak amplitude parameter and the estimation of the corresponding lineshape/damping parameters. The key question is how to handle this interdependence while mathematically converging to a solution that has a physical meaning. Moreover, the estimation should be repeatable, robust to some signal

variation; would it be noise or small phase/baseline variation. The final estimates are expected to be sufficiently sensitive to detect possible disease-related metabolic variations. When adopting a model that is intended to fit the whole lipid spectrum pattern, the parameters are so dependent on each other that the inverse problem to solve becomes increasingly ill-conditioned. Two alternatives are then possible: a) either simplify the model, in other words reduce the number of parameters to fit with sufficient and correct prior knowledge to alleviate multicollinearity effects resulting from correlated parameters or b) find a regularization strategy that can handle the ill-posed problem (as most probably performed by LCModel). The *ndb-nmidb* quadratic link (Bydder, Girard, and Hamilton 2011), assumed in  $M_{TG\_param}$  might hide physiologically relevant information. As the result, the user is advised to carefully question the constraints and prior knowledge used in the fitting procedure.

To conclude, a quantification approach inspired from quantitative MGE-MRI has been compared to standard MRS method and shows interesting properties in terms of robustness and test-retest variability, at the expense of a possible bias. This work contributes to assembling the quantification approach used in quantitative MRI and the historical gold standard spectroscopy.

## 2.2.5. APPENDIX

### Theoretical comparison of the quantification approaches

Here, an approach based on Information Theory is used for theoretical comparison of the  $M_{TG\_param}$  and  $M_{peak}$  approaches. For each model function, realistic parameter values were used (described in table 2.4) to correspond to *in vitro* and *in vivo* conditions. The condition number of the Jacobian matrix (cond-J), the correlation matrix and the parameter uncertainty  $\frac{\Delta\theta}{\theta}$  were computed (the relative CRLBs  $\frac{\Delta\theta}{\theta} = \sigma_0 * \frac{\sqrt{F(\theta)^{-1}}}{\theta}$ , where  $\theta = \{ndb, nmidb \text{ or } c_1, c_3, c_8\}$ ,  $F^{-1} = \Re(J^T \cdot J)^{-1}$ ; the inverse Fisher matrix and  $\sigma_0$  the standard deviation of noise, and for PUFAindx, MUFAindx and SFAindx the calculation is detailed in Table A1).

The resonance frequencies  $f_k$ , relaxation times  $T2_w$  and  $T2_k$  were assumed to be fixed and equal as if they had been previously estimated. TE was set to 0. For the  $M_{TG\_param}$  quantification case, five parameters ( $A_w, A_f, ndb, nmidb, T2^*$ ) were considered as estimated. For the  $M_{peak}$  quantification, 2\*9 parameters ( $\alpha_1, \dots, \alpha_9, c_1, \dots, c_9$ ) were considered as estimated. To be sure that the two models described mathematically the same signal and to

simplify the comparison, for the  $M_{\text{peak}}$  quantification we used the following parameters:  $\varphi_0 = 0$ ,  $\alpha_k = -\left(\frac{1}{T_2'} + \frac{1}{T_{2k}}\right) = -\frac{1}{T_2^*}$ ,  $\beta_k = 0$ ,  $c_k = A_f * n_k(\text{ndb}, \text{nmidb}, \text{CL})$  for  $k = \{1, \dots, 8\}$ ,  $c_9 = A_w * n_{\text{water}}$ ,  $\alpha_9 = -\left(\frac{1}{T_2'} + \frac{1}{T_{2w}}\right) = -\frac{1}{T_2^*}$ .

The results on this theoretical model comparison are summarized in table 2.4. The condition number of the  $M_{\text{peak}}$  were  $10^3$  times higher than the condition number of the  $M_{\text{TG\_param}}$ . As expected, the uncertainties increased when the condition number was higher, so the  $M_{\text{peak}}$  had uncertainties higher than the  $M_{\text{TG\_param}}$ . The segmented process of the  $M_{\text{TG\_param}}$  gave uncertainties lower than if we estimated all the parameters all at once (table 2.4). The condition number of the  $M_{\text{TG\_param}}$  was greatly influenced by the  $A_f$  and  $A_w$  values without impacting the uncertainty values of  $\text{ndb}$  and  $\text{nmidb}$ . It appeared that if we normalized the  $A_f$  and  $A_w$  values by the factor  $(1/(A_f + A_w))$ , the condition number was lower, so we used this correction for the results summarized in table 2.4. The correlation matrix of the  $M_{\text{peak}}$  indicated that  $\alpha_k$  and  $c_k$  were strongly correlated with a Pearson coefficient ( $r$ ) of 0.71 for each resonance. For the  $M_{\text{TG\_param}}$  with no constraint on parameters  $\text{ndb}$  and  $\text{nmidb}$ , the correlation matrix showed a strong correlation between  $\text{ndb}$  and  $\text{nmidb}$  ( $r = 0.80$ ), and a moderate correlation between  $A_f$  and  $\text{ndb}$  ( $r = 0.62$ ),  $A_f$  and  $\text{nmidb}$  ( $r = 0.42$ ), and  $A_f$  and  $T_2'$  ( $r = 0.41$ ).

**Table 2.3: Definition of PUFAindx, MUFAindx and SFAindx calculations with parameters estimated with the two models studied and their measurement uncertainty calculations.**

Definition of PUFAindx, MUFAindx and SFAindx calculations with parameters estimated with the two models studied and their measurement uncertainty calculations. For the $M_{\text{TG\_param}}$ the uncertainties of $\text{ndb}$ and $\text{nmidb}$ were given directly by the relative CRLBs; for the $M_{\text{peak}}$ quantification they were calculated with the ratio of amplitude $c_k$ .			
	Calculations	Measurement uncertainty calculations	
ndb and nmidb calculations for the $M_{\text{peak}}$ with estimated parameters			
ndb	$= \frac{1}{2} * \left(9 * \frac{c_1}{c_8} - 1\right)$	$\frac{\Delta \text{ndb}}{\text{ndb}}$	$= \frac{\Delta c_1}{c_1} + \frac{\Delta c_8}{c_8}$
nmidb	$= \frac{9}{2} * \frac{c_3}{c_8}$	$\frac{\Delta \text{nmidb}}{\text{nmidb}}$	$= \frac{\Delta c_3}{c_3} + \frac{\Delta c_8}{c_8}$
PUFAindx, MUFAindx and SFAindx calculations for the two models			
PUFAindx	$= 100 * \frac{\text{nmidb}}{3}$	$\frac{\Delta \text{PUFAindx}}{\text{PUFAindx}}$	$= \frac{\Delta \text{nmidb}}{\text{nmidb}}$
MUFAindx	$= 100 * \left(\frac{\text{ndb} - \text{nmidb}}{3} - \frac{\text{nmidb}}{3}\right)$	$\frac{\Delta \text{MUFAindx}}{\text{MUFAindx}}$	$= \frac{\Delta \text{ndb} + 2 * \Delta \text{nmidb}}{\text{ndb} - 2 * \text{nmidb}}$
SFAindx	$= 100 * \left(1 - \frac{\text{ndb} - \text{nmidb}}{3}\right)$	$\frac{\Delta \text{SFAindx}}{\text{SFAindx}}$	$= \frac{\Delta \text{ndb} + \Delta \text{nmidb}}{\text{ndb} - \text{nmidb}}$

**Table 2.4: Results of measurement uncertainty calculations of  $ndb$ ,  $nmidb$  PUFAindx, MUFAindx and SFAindx with *in vivo* parameters correspond to the expected fatty acid composition of human subcutaneous abdominal adipose tissue (18% PUFA, 54.6% MUFA and 27.4% SFA (23)). The condition number of J explodes for  $M_{peak}$ . For  $M_{TG\_param}$ , undersampling reduces the condition number of J for “*in vitro*”. Uncertainties were good for each model but increased when J was poorly conditioned.**

Spectrum	Vector of parameters $\theta$	Sampling	Condition number of the Jacobian matrix	$\frac{\Delta ndb}{ndb}$ in %	$\frac{\Delta nmidb}{nmidb}$ in %	in $\frac{\Delta PUFAindx}{PUFAindx}$ in %	$\frac{\Delta MUFAindx}{MUFAindx}$ in %	$\frac{\Delta SFAindx}{SFAindx}$ in %
<i>In vivo</i> $A_w=1.0*1E-6$ ; $A_f=3.7*1E-5$ ; $ndb = 2.7$ ; $nmidb = 0.54$ ; $T2^*=22.4ms$ $SNR = 210$	$(A_w, A_f, ndb, nmidb, T2^*)$	Full	91.58	0.99	6.54	6.54	6.02	7.40
	$(A_w, A_f, ndb, nmidb, T2^*)$	Under	121.40	1.52	10.15	10.15	9.30	11.41
	$(A_w, A_f, ndb, nmidb, T2^*)$ with sub-process	Full	33.00	0.90	1.61	1.61	2.57	3.92
	$(A_w, A_f, ndb, nmidb, T2^*)$ with sub-process	Under	33.99	1.35	2.45	2.45	3.89	5.92
	$(\alpha_1, \dots, \alpha_9, c_1, \dots, c_9)$	Full	2.18E+03	3.85	14.90	14.90	16.34	21.94
	$(\alpha_1, \dots, \alpha_9, c_1, \dots, c_9, f_1, \dots, f_9)$	Full	1.13E+04	4.89	18.98	18.98	20.80	27.91
	$(\alpha_1, \dots, \alpha_9, c_1, \dots, c_9, \beta_1, \dots, \beta_9, f_1, \dots, f_9)$	Full	1.22E+06	8.51	34.20	34.20	36.98	49.33

# Conclusion

Nous avons abordé au cours de ce chapitre la problématique liée à la quantification lipidique à partir du signal de spectroscopie. Fondé sur les travaux de Mosconi et al. (2014) qui ont montré que l'estimation finale de la composition lipidique pouvait varier de façon importante selon la méthode utilisée (AMARES, LCMoDel, QUEST ...), nous nous sommes interrogés sur l'impact de la fonction modèle utilisée. Notamment, dans le cas de l'étude du spectre RMN des lipides, il est probable d'être confronté à un problème mal posé. Nous avons montré dans ce chapitre que l'utilisation de modèle de plus en plus complexe pour l'estimation paramétrique de la composition lipidique n'était pas la meilleure solution. Cette pratique est pourtant utilisée dans plusieurs articles (Lundbom et al. 2010; Hamilton et al. 2017), avec par exemple plusieurs pics de résonance utilisés pour décrire la résonance du méthylène. Dans le cas des lipides, la fonction modèle peut être adaptée à la nature de l'objet étudié comme ici les chaînes de triglycérides. Ainsi, l'utilisation d'une fonction modèle simplifiée avec une implémentation spécifique qui permet de réduire le nombre de paramètres à estimer apparaît, d'après nos résultats, être une solution pertinente pour l'étude des spectres *in vivo*. Cette méthode peut pourtant apparaître contre-intuitive et déstabilisante pour la communauté orientée spectroscopie RMN, car la méthode ne s'emploie pas à modéliser parfaitement le signal acquis mais plutôt à trouver de façon robuste les paramètres d'intérêt. Les estimations les plus communément réalisées jusqu'ici étaient fondées sur le calcul des amplitudes des différentes résonances lipidiques, puis des rapports de ces amplitudes étaient faits afin d'avoir la composition lipidique. Dans ce chapitre, nous avons donc montré que l'utilisation d'un modèle simplifié – similaire à celui utilisé en IRM – constituait une solution valable avec de faibles variabilités des résultats et suffisamment de sensibilité pour refléter correctement la composition lipidique - mais avec comme contre-partie- un possible biais de mesure qui dépend des *a priori* utilisés.

# Chapitre 3

## Etude clinique Poly-Nut

### Sommaire

---

3.1. Utilisation de la séquence multi-écho de gradient pour la quantification du contenu lipidique .....	73
3.1.1. Introduction .....	74
3.1.2. Materials and methods.....	75
3.1.3. Results .....	83
3.1.4. Discussion .....	91
3.2. Effet des polyphénols couplés à la surnutrition.....	95
3.2.1. Données anthropométriques .....	96
3.2.2. Effet sur le foie .....	97
3.2.3. Effet sur la composition lipidique des tissus adipeux.....	99
3.2.4. Discussion .....	102
Conclusion .....	102

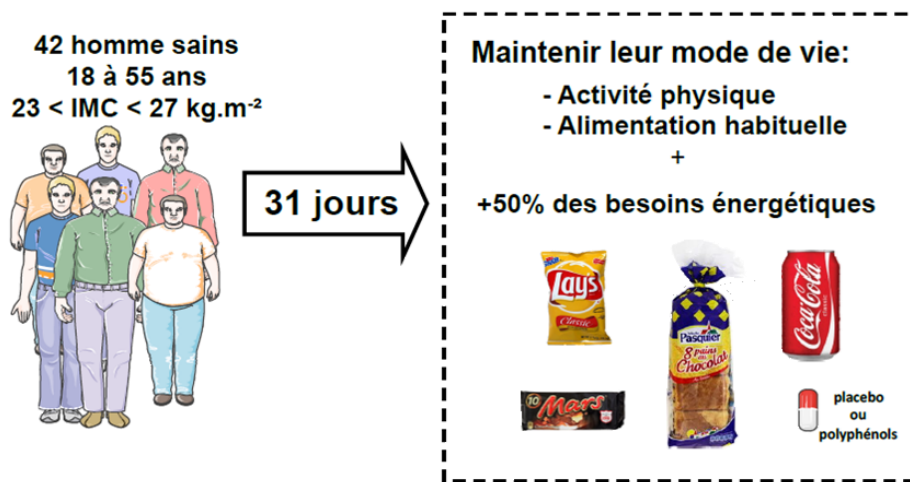
---

L'étude POLY-NUT est promue par les hospices civils de Lyon. Le professeur Martine LAVILLE, directrice du Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes en est l'investigatrice principale et coordinatrice. Cette étude regroupe des scientifiques dans les domaines du traitement du signal et de l'imagerie, des médecins, des biologistes, des pharmaciens, un biologiste-biostatisticien, des infirmières et une diététicienne.

Les polyphénols, déjà utilisés comme additifs par l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique, sont des molécules présentes à l'état naturel dans notre alimentation comme dans les peaux de raisin. L'objectif principal de Poly-Nut est de démontrer qu'en période de surnutrition, les sujets recevant des polyphénols sont ceux qui ont la plus faible altération de leur sensibilité à l'insuline. Poly-Nut a pour objectif secondaire l'étude des différents effecteurs des polyphénols modulant la sensibilité à l'insuline. Ainsi les modifications de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, répartition et composition de la masse grasse abdominale) figurent parmi les nombreux marqueurs biologiques d'intérêt. Selon des recherches antérieures, les polyphénols permettraient, entre autres, de protéger le foie (Anhê et al. 2015) et le tissu musculaire de l'accumulation de triglycérides en stimulant l'oxydation lipidique (Timmers et al. 2011).

Le protocole consiste à faire consommer à des hommes volontaires sains (critères figure 3.1) pendant un mois 50% des besoins énergétiques journaliers en supplément de leur alimentation habituelle et sans activité physique supplémentaire (le régime se compose de chips, sodas, pains au chocolat et barres chocolatées). De plus, chaque sujet a reçu de manière randomisée, contrôlée, en double aveugle soit des gélules placebo (2g de lactose), soit des gélules de polyphénols (2g resvératrol extrait de raisin). Seul le biostatisticien de l'étude connaissait initialement l'attribution des gélules qui a été dévoilée à la fin de l'étude (juin 2017). L'étude est approuvée par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) de Lyon et est en accord avec la déclaration d'Helsinki II et la loi française Huriet-Serusicat. Ce protocole est enregistré sur le site [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) (NCT02145780).





**Figure 3.1 : Schéma récapitulant les principaux critères d'inclusion de l'étude Poly-Nut des sujets ainsi que le protocole de surnutrition (figure extraite de la thèse de Kévin Seyssel 2015).**

Après avoir développé dans le chapitre 2 une méthode de traitement du spectre RMN, nous nous sommes concentrés sur la quantification des graisses par le biais de l'IRM. Un premier article uniquement fondé sur les données du groupe placebo a été accepté pour publication dans le journal « Journal of Magnetic Resonance Imaging ». Le principal objectif est d'évaluer la capacité de la méthode IRM à détecter des changements des paramètres quantitatifs (quantité de graisse dans le foie par la PDFFF, volume et composition en acide gras des tissus adipeux) en s'appuyant de contre mesure telle que la DEXA, SRM et la chromatographie en phase gazeuse. Cet article constitue la première partie de ce chapitre. Une fois la méthodologie développée et validée, dans la deuxième partie de ce chapitre, une analyse des différences entre le groupe placebo et polyphénol est présentée.

### **3.1. Utilisation de la séquence multi-écho de gradient pour la quantification du contenu lipidique**

Cette section reprend l'article intitulé "3D chemical shift-encoded MRI for volume and composition quantification of abdominal adipose tissue during an overfeeding protocol in healthy volunteers" accepté pour publication dans le journal " Journal of Magnetic Resonance Imaging " avec la liste de co-auteurs suivante : Angeline Nemeth, Bérénice Segrestin, Benjamin Leporq, Kevin Seyssel, Khuram Faraz, Valérie Sauvinet, Emmanuel Disse, Pierre-Jean Valette, Martine Laville, Hélène Ratiney et Olivier Beuf.

### 3.1.1. Introduction

Obesity is a complex disease combining genetic factors still poorly identified and environmental factors mainly related to diet and physical inactivity (Heymsfield and Wadden 2017). Overweight and obesity are major worldwide health issues increasing the risk to develop pathologies such as diabetes, cardiovascular disease and Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD). Although obesity is defined by a body mass index (BMI) greater than or equal to  $30 \text{ kg/m}^2$  for humans, distribution of adipose tissue is decisive in the assessment of cardio-metabolic risk factors (Lee et al. 2018). People with abdominal fat accumulation have commonly an altered metabolic profile (also called metabolic syndrome). The expansion of visceral adipose tissue (VAT), leading to an increase in waist circumference, is associated with a higher risk to develop insulin resistance and type 2 diabetes unlike the expansion of subcutaneous adipose tissue (SAT) (Alligier, Gabert, et al. 2013). The BMI is not relevant to predict these risks because no distinction is made between fat mass and lean mass. Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) allows measurement and distribution of body fat. To be more accurate, some imaging modalities like Magnetic Resonance Imaging (MRI) and computed tomography (CT) (Chowdhury et al. 1994) can assess independently the distribution of SAT and VAT unlike DEXA. The major drawback of CT is the ionizing radiation exposure of patients whereas MRI allows the measurement of fat volumes without any known short- or long-term side effects. Over the last decades, various segmentation methods of SAT and VAT volume have emerged based on various MRI acquisition such as T1-weighted, T2-weighted or chemical-shift encoded imaging (CSE-MRI), each one with advantages and disadvantages (H. H. Hu and Kan 2013). T1-weighted and T2-weighted image contrast varies with B0 field strength which can be a problem in the reproducibility of the results in multi-center studies. CSE-MRI can give an accurate estimate of proton density fat fraction (PDFF) which is a biomarker (Reeder, Hu, and Sirlin 2012). Beyond volume quantification, the lipid composition of these tissues could be a relevant biomarker (Petrus et al. 2017). When analyzed by mass spectrometry (Jové et al. 2013), fatty acid composition (FA) of AT has been associated with AT function (adipogenesis, differentiation, lipid metabolism) with large differences between SAT and VAT, shedding light on the pathophysiology of metabolic diseases (Hodson, Skeaff, and Fielding 2008; Jové et al. 2013). This analysis requires access to human tissue, and cannot be widely proposed. Surrogate markers of lipid composition of AT are needed. Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) is able to provide non-invasively the proportions of saturated (SFA), monounsaturated

(MUFA) or polyunsaturated (PUFA) fatty acids. Recent studies (Benjamin Leporq et al. 2014; Peterson and Månsson 2013; Bydder, Girard, and Hamilton 2011) demonstrated the feasibility of assessing the composition of fat based on multiple gradient echo imaging also named chemical shift-encoded MRI (CSE-MRI). Studies focusing on liver diseases have extensively compared the MRS and MRI methods for the quantification of the PDFF (Achmad et al. 2015; Zand et al. 2015; Tyagi et al. 2015).

The aim of this work was to assess CSE-MRI method to detect content and composition changes of fat storage in healthy volunteers during a 31 days overfeeding protocol while comparing CSE-MRI results with DEXA, MRS and GC-MS measurements.

### **3.1.2. Materials and methods**

#### ***3.1.2.1. Overfeeding protocol***

From February 2014 to December 2016, volunteers were recruited via notice boards and electronic bulletins. To be eligible, participants had to be a man aged between 18 and 55 years with a BMI between 23.0 kg/m<sup>2</sup> and 27.0 kg/m<sup>2</sup> and a low physical activity. Volunteers were excluded if they had personal medical history of type 1 or 2 diabetes. Written informed consent was obtained from all the subjects. All men underwent 31 days of high-sucrose and high-fat overfeeding by eating the equivalent of +50% of their daily energy requirements while maintaining their eating and sport activity habits. This protocol was validated by an ethics committee and was registered on the clinicaltrials.gov site (NCT02145780). Only results from subjects with a placebo complement to their eating were reported in this paper.

#### ***3.1.2.2. Imaging and spectroscopy protocol***

##### **MRI**

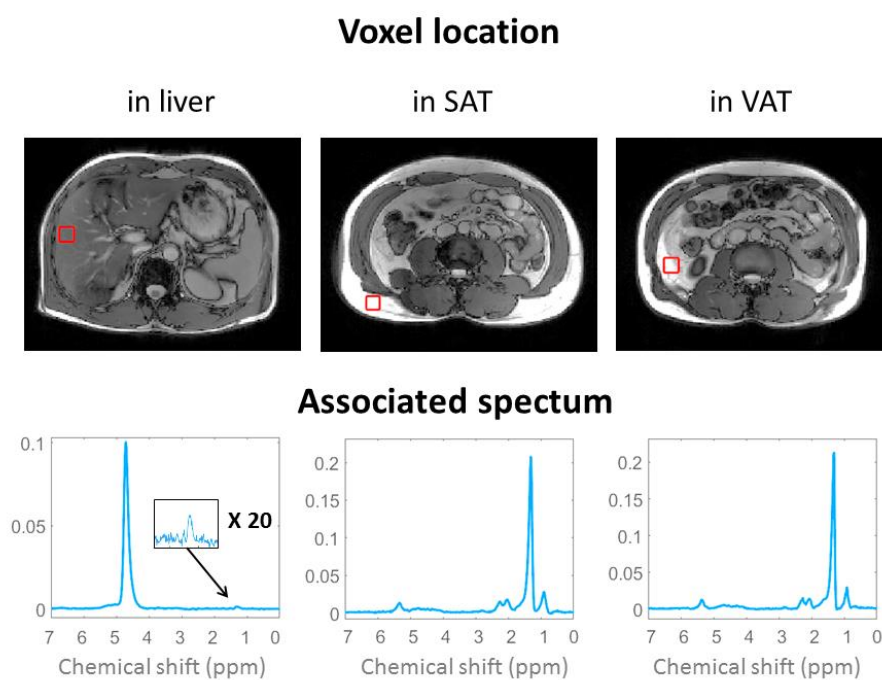
Subjects underwent two 3D spoiled-gradient multiple echo sequence on a 3T Ingenia Philips system (Philips Healthcare, Best, the Netherlands): one before the overfeeding at day 0 (MRI1) and the second at day 31 (MRI2). 3D MRI acquisitions parameters were the following: 8 echoes ( $n \times 1.15$  ms TE with  $n=1, \dots, 8$ ), 5° flip angle, 10.3 ms TR, 384 x 420 x 320 mm<sup>3</sup> FOV, 256 x 256 x 80 matrix size, 20.8 s scan time. This acquisition was made in breath-holding. The subjects were in supine position with both arms aligned along the body. For signal reception, a 32-channel abdominal body-array coil was used. The acquisition was performed on the abdominal region, encompassing L1 to L5 lumbar vertebrae and the liver.

## DEXA

Fat weight and lean weight were determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA, Lunar Prodigy GE Medical Systems). Subjects underwent two whole-body DEXA scanning: one before the overfeeding (or day 0) and the other after the overfeeding (day 28 or day 31). Fat weight of android region from DEXA was compared to CSE-MRI measurement. The android region was the area between the ribs and the pelvis (top of the iliac crest) (Stults-Kolehmainen et al. 2013) and was close to the defined region in MRI method.

## Spectroscopy

Subjects underwent two STEAM sequences in a row for test-retest using respiratory triggering with voxel placed in liver, VAT and SAT tissues (parameters in the caption of figure 3.2). This protocol was performed at the baseline examination (MRS1) and repeated after the overfeeding (MRS2).



**Figure 3.2 :** A STEAM sequence was acquired in liver, subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue (VAT) using the following parameters: TR = 3000 ms, TE= 14 ms, TM= 10 ms, VOI of 20×20×20 mm<sup>3</sup>, no water suppression, 2048 Hz bandwidth, 1024 data points, 4 signal averages for VAT and SAT and 32 signal averages for the liver. For SAT and VAT, further acquisitions were made with TE = [24, 34, 44, 54, 64] ms.

### **3.1.2.3. FA analysis by Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS)**

The total FA compositions of the SAT samples were determined independently by GC-MS. FAs profiles were obtained from the triacylglycerol (TAG) fraction which is representative of the intracellular content of the SAT.

### Sample collect

A needle biopsy of abdominal SAT was performed 10cm from the umbilicus, under local anesthesia (1% lidocaine, BD microlance 21G 1<sup>1/2</sup> inch, 0.8\*40mm needles), for 300mg to 1g adipose tissue samples). Subsequent biopsy was taken contralaterally. Fat samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C.

### Sample preparation

Approx. 50 mg cryogenically crushed sample were weighed exactly before proceeding to the total lipid extraction using 6 mL of a mixture of chloroform/methanol (2:1, vol:vol) according to the Folch method (Folch, Lees, and Sloane Stanley 1957). An internal standard (TAG C17:0, glycerol triheptadecanoate), corresponding to 60µg of C17:0 /mg of tissue, was added in order to quantify the FAs occurring from the TAG fraction. The TAG fraction was then obtained from 1/40e of the total lipid extract by thin-layer chromatography on silica-gel plates with a mobile phase of hexane: diethyl ether:acetic acid (80:20:1, vol:vol:vol) and was submitted to direct methylation according to a modification of the technique described elsewhere (Gabert et al. 2011).

### GC-MS analysis

The amounts of FAs were measured by GC/EI-MS (EI: electron ionization) using a quadrupole mass spectrometer (model MS 5975, Agilent Technologies, Massy, France) connected to a gas chromatograph (model GC6890, Agilent Technologies) equipped with a fused-silica column (SP2380, 60 m x 0.20 mm x 0.25 µm film thickness; Supelco). Injection (1 µL) was performed in splitless mode at 240 °C. FAs were separated with the following oven program: (a) 50 °C for 1 min; (b) increase at a rate of 20 °C.min<sup>-1</sup> to 175 °C and hold for 9.75 min; (c) increase at a rate of 2 °C.min<sup>-1</sup> to 217 °C and hold at 217 °C for 1 min. Mass spectra were obtained from the Total Ion Chromatogram (TIC) over a mass range of m/z 35–450.

### Comparison with NMR methods

In order to obtain comparable results between the GC-MS and NMR methodologies, the mean number of double bound ( $ndb_{GC}$ ) and the mean of methylene-interrupted double bound ( $nmidb_{GC}$ ) by triglyceride chain were computed as:

$$\begin{cases} ndb_{GC} = \left( \sum_i^N ndb_i \times p_i \right) \times 3 \\ nmidb_{GC} = \left( \sum_i^N nmidb_i \times p_i \right) \times 3 \\ CL_{GC} = \sum_i^N CL_i \times p_i \end{cases} \quad (3.1)$$

Where  $N$  was the number of the different type of FAs analyzed,  $ndb_i$  number of double bound of the  $i^{\text{th}}$  FA,  $nmidb_i$  number of methylene-interrupted double bound of the  $i^{\text{th}}$  FA,  $CL_i$  the number of carbon in FA chain and  $p_i$  the relative proportion in percentage of the  $i^{\text{th}}$  FA.

### 3.1.2.4. MRS signal processing and analysis

For spectrum acquired in SAT, similarly to the eddy current correction performed usually using the water phase signal, the time dependent phase variation of the signal of the first echo (TE=14ms) was corrected with the time dependent phase of the second echo (TE=24ms) which was less impacted by eddy current effects. This correction was possible because 1) the methylene  $-CH_{2n}-$  amplitude peak was the unique preponderant component, and 2)  $\Delta TE = TE_2 - TE_1$  was small compared to the lipid T2 and  $1/J$  ( $4 < J < 8\text{Hz}$ , for in vivo FA spectral). This correction needs exactly the same frequency content in the two spectra. So it was not applied to the spectra from the VAT tissue because of the presence of a low water peak in some case. In this latter case, the signal is probably altered due to peristalsis of the digestive tract from one echo to the other which could explain why the water peak contribution varies from one echo to the other. The quantification method, described shortly below and in (Nemeth et al. 2018), was applied only on the spectrum of the first echo; the other echoes were acquired to estimate the  $T_{2k}$ s, i.e the apparent T2 of each resonating lipid component ( $k \in [1, \dots, 10]$ ).  $T_{2k}$  estimations were made in the frequency domain, for each resonance, with a nonlinear least-square estimation of the mono-exponential  $S_k(TE) = S_{0k} \cdot \exp(-TE/T_{2k})$ , where  $S_k(TE)$  was the measured integral of the  $k^{\text{th}}$  peak at TE (6 echoes varying regularly from 14ms to 64ms by step of 10ms),  $S_{0k}$  the amplitude at TE=0 and  $T_{2k}$  the T2 of the  $k^{\text{th}}$  peak.

To quantify the PDFF in the liver, a Voigt (Ratney et al. 2008) model with 2 peaks was applied on the spectrum to estimate the amplitude of the water peak at 4.7ppm and the main peak of fat at 1.3 ppm. The PDFF was then computed by  $PDFF = A_f / (A_w + A_f)$ . The non-

linear least square optimization of the Voigt model was applied on the 200 first points of the FID (~100ms and omitting the first point).

The MRS results reported in the rest of the paper are the mean quantification values of the two consecutive acquisitions.

### 3.1.2.5. CSE-MRI processing and analysis

#### Automated Segmentation Method of SAT and VAT

Automatic segmentation was simultaneously performed exploiting the PDFFF mapping described in (Benjamin Laporq et al. 2013) as well as the first and second echo images (out of phase and in phase respectively) to separate SAT from VAT. An operator determined the slices corresponding to the upper of L2 and the lower of L4. A first reference slice chosen by the user in the stack of images was segmented automatically. Manual correction can be done if necessary. Thanks to 3D acquisition and low partial volume effect, the mask of a slice (reference slice for the beginning) was used as *a priori* knowledge for the determination of the next slice mask using the Lankton level set algorithm (Lankton and Tannenbaum 2008). After segmentation, two binary masks were created one for SAT and the other for VAT and multiplied to the PDFFF map (PDFFF<sub>SAT</sub> and PDFFF<sub>VAT</sub> map). Only pixels with a PDFFF higher than 55% were kept in order to remove vertebrae and intramuscular adipose tissue contributions to VAT volume. In some regions of large static field inhomogeneity, at the level of iliac crests, fat/water swaps led to erroneous PDFFF contribution in particular in SAT. In this case, a manual correction was made.

#### SAT, VAT and TAT volumes

The SAT and VAT masks were binary images. The total abdominal adipose tissue (TAT) was calculated by adding the SAT and VAT masks. Adipose tissue volumes were calculated by counting all pixels in the mask of SAT (or VAT or TAT) considering that each pixel represented 100% of fat and multiplying by the elementary volume (voxel of  $9.84 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$ ). The total abdominal adipose tissue (TAT) volume delimited by the L2 and L4 vertebrae was converted into mass using the assumed an average density of  $0.92 \text{ g/cm}^3$  (Snyder et al. 1975) and compared to the DEXA measurement on android region. The total fat content in android region considering the PDFFF of the tissues (adipose tissues, muscles and vertebrae) was also analyzed and computed as the sum of each element of the matrix defined by  $(\text{PDFFF}_{\text{SAT}} + \text{PDFFF}_{\text{VAT}}) * 9.84 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 * 0.92 \text{ g/cm}^3$ .

### Fat content in the liver

The region of interest (ROI) in the liver was manually defined on a unique slice on which the right hepatic portal vein appeared the largest in axial plane. The mean value of PDFF in this ROI was computed. To compare CSE-MRI and MRS measurements, the mean PDFF value was computed in an ROI corresponding to the MRS voxel size and labeled “localized CSE-MRI measurement”. This ROI was located automatically on the CSE-MRI data using MRS voxel coordinates. MRI was acquired in breath-holding whereas MRS was in free breathing. This difference led to localization errors of ROI on CSE-MRI. Thus, a manual ROI repositioning was visually performed in the liver.

#### **3.1.2.6. Calculation of FA composition (CSE-MRI and MRS)**

To avoid any difference linked to data processing, the FA quantification method used the same model function and implementation for CSE-MRI (Benjamin Leporq et al. 2014) and MRS (Nemeth et al. 2018). Indeed, in this previous publication (Nemeth et al. 2018), it has been shown that, despite different J-evolutions between STEAM sequence and 3D CSE-MRI, the model used in CSE-MRI can be used for MRS data analysis and lead to consistent results. FA composition was determined by a fitting procedure applied in the time domain on specific points defined by the methylene chemical shift:  $t = t_n * t_e$  with  $t_e = \pi / ((4.7 - 1.3) * B_0 * \gamma) = 1.15$  ms and  $n=1, \dots, 32$  for MRS processing and  $n=1, \dots, 8$  for CSE-MRI. The model function used was defined as:

$$f(t) = \text{real} \left( \left[ A_w \times n_{\text{water}} \times e^{\frac{-(TE+t)}{T2_w}} + A_f \times \sum_{k=1}^8 \left( n_k(\text{ndb}, \text{nmidb}, \text{CL}) \times e^{2\pi i \Delta f_k t} \times e^{\frac{-(TE+t)}{T2_k}} \right) \right] \times e^{\frac{-t}{T2'}} \right) \quad (3.2)$$

where  $A_w$  and  $A_f$  represent the numbers of water and triglycerides molecules respectively,  $n_k(\text{ndb}, \text{CL}, \text{nmidb})$  the number of protons in the fat spectrum component  $k$  in terms of  $\text{ndb}$ ,  $\text{CL}$  and  $\text{nmidb}$  (Table 3.1) the frequency shift between water and each fat spectrum component  $k$ ,  $n_{\text{water}}$  the number of protons in a water molecule,  $T2_k$  the transverse relaxation of the  $k^{\text{th}}$  peak,  $T2_w$  the transverse relaxation of the water peak, and the  $T2'$  the global relaxation time decay induced by  $B_0$  dispersion. For MRS processing, the  $T2_k$ -values were estimated before the fitting and  $T2'$  was estimated during the processing ( $TE = 14$  ms). For CSE-MRI processing, the global apparent  $T2^*$  ( $1/T2^* = 1/T2 + 1/T2'$ ) value was computed ( $TE = 0$  ms). FA composition was derived from  $\text{ndb}$  and  $\text{nmidb}$  with the following relations (Peterson and Månsson 2013):



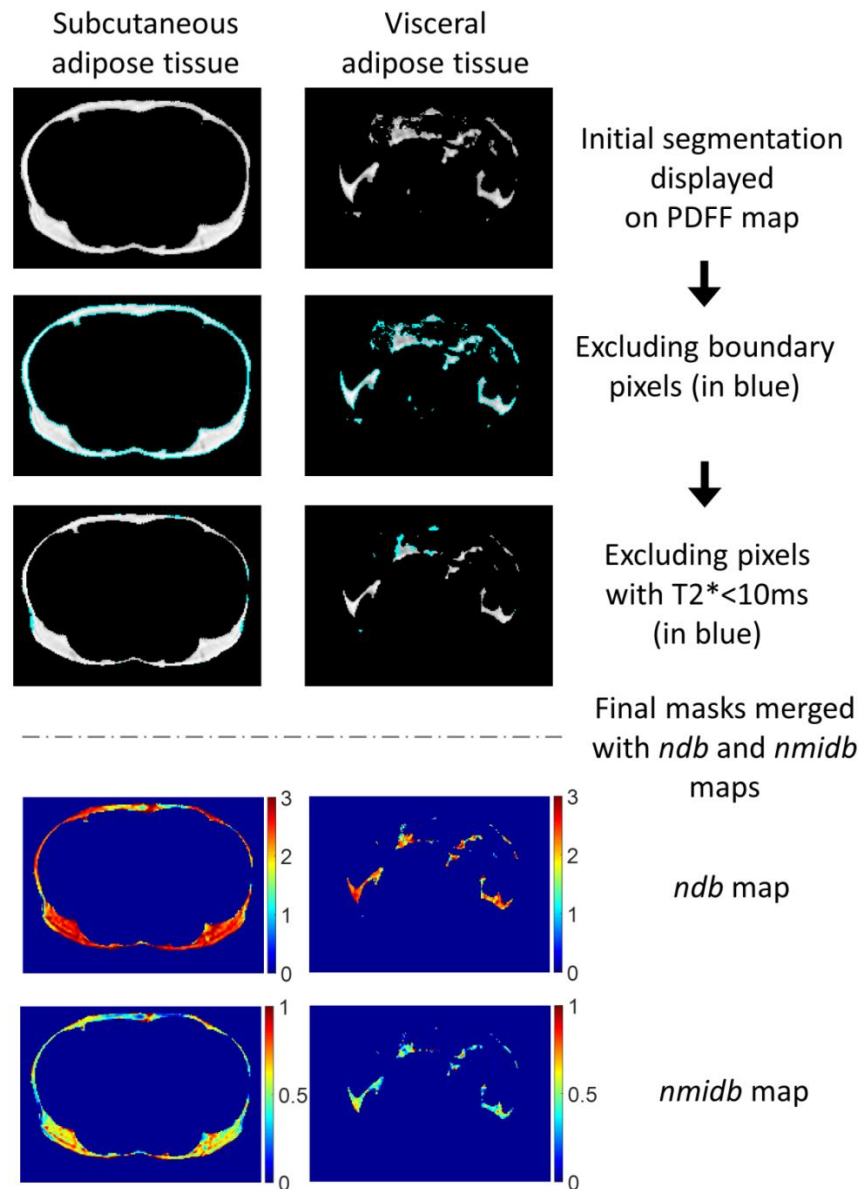
$$\begin{cases} PUFA_{indx} = \frac{nmidb}{3} \times 100 \\ MUFA_{indx} = \frac{(ndb - 2 \times nmidb)}{3} \times 100 \\ SFA_{indx} = 100 - PUFA_{indx} - MUFA_{indx} \end{cases} \quad (3.3)$$

$PUFA_{indx}$  is the relative proportion of polyunsaturated FA,  $MUFA_{indx}$  the relative proportion of mono-unsaturated FA and  $SFA_{indx}$  the relative proportion of saturated FA.

Parameters conditioning the fat spectrum model used				
Component k	Type	$\Delta f_k$ (Hz)	Chemical shift (ppm)	$n_k(ndb, nmidb, CL)$
1	Olefinic + Glycerol	-74.9	5.29 5.19	2 x ndb +1
water	-	0	4.70	$n_{water} = 2$
2	Glycerol	63.5	4.20	4
3	Dyacyl	247.7	2.75	2 x nmidb
4	$\alpha$ -carboxyl	312.4	2.24	6
5	$\alpha$ -olefinic	340.4	2.02	4 x (ndb-nmidb)
6	$\beta$ -carboxyl	393.7	1.60	6
7	Methylene	431.8	1.30	$6x(CL-4)-8x ndb + 2x nmidb$
8	Methyl	482.6	0.90	9

**Table 3.1: Parameters conditioning the fat spectrum model used.  $\Delta f_k$ , frequency shift between water and each fat resonance.**

The CSE-MRI measurement of  $PUFA_{indx}$  (respectively  $MUFA_{indx}$  and  $SFA_{indx}$ ) was calculated on whole-segmented volume of SAT (respectively VAT). To see the influence of the inhomogeneity of the B0 field, another calculation was also computed excluding pixels at the boundary between air/water or fat interface and pixels with an estimation of T2\* under 10 ms (figure 3.3).



**Figure 3.3: Procedure of pixel exclusion after the initial segmentation to compute the mean *ndb* (number of double bonds) and *nmldb* (number of methylene-interrupted double bonds). Pictures in grey scale are displaying the subcutaneous and visceral adipose tissue masks merged with the PDFF maps. Pictures in color scale are displaying the subcutaneous and visceral adipose tissue masks merged with the *ndb* and *nmldb* maps.**

### 3.1.2.7. Statistical Analysis

Anthropometric measurements are expressed as mean  $\pm$  SEM. Pearson's correlation coefficient and Bland Altman plot were used to compare reference measurements (DEXA or MRS) and CSE-MRI measurements. Coefficient of variation (CV) was computed to analyze the variability of the measurements. Paired t-tests were performed to compare data from MRI1 (or MRS1) and MRI2 (or MRS2) for each quantified parameters (PDFF in the liver, volume and FA composition of AT). The normality of each data distribution was tested using

the Shapiro-Wilk test. In the case of non-normal distribution, a paired sample Wilcoxon rank test (non-parametric test) was performed in addition to the t-test. P-value <0.05 was considered as significant. Statistical analyses were made with the software OriginPro 8.5.1 SR2 (OriginLab Corporation, Northampton, England).

### 3.1.3. Results

#### 3.1.3.1. Subjects

Baseline characteristics of 21 non-obese healthy male volunteers are summarized on table 3.2. An MRI examination after overfeeding could not be performed for one subject and the MRS acquisitions from another subject before overfeeding were missing.

**Table 3.2: Measurements of the cohort before and after overfeeding. Data are expressed as mean SEM. \* indicate significant difference due to overfeeding paired t-test \*\*\*p<0.001. SAT: abdominal subcutaneous adipose tissue from L2 to L4; VAT: visceral adipose tissue from L2 to L4; TAT: total abdominal adipose tissue (SAT+VAT); PDFF: proton density fat fraction; FA: fatty acid; ndb, number of double bonds; nmldb, number of methylene-interrupted double bonds.**

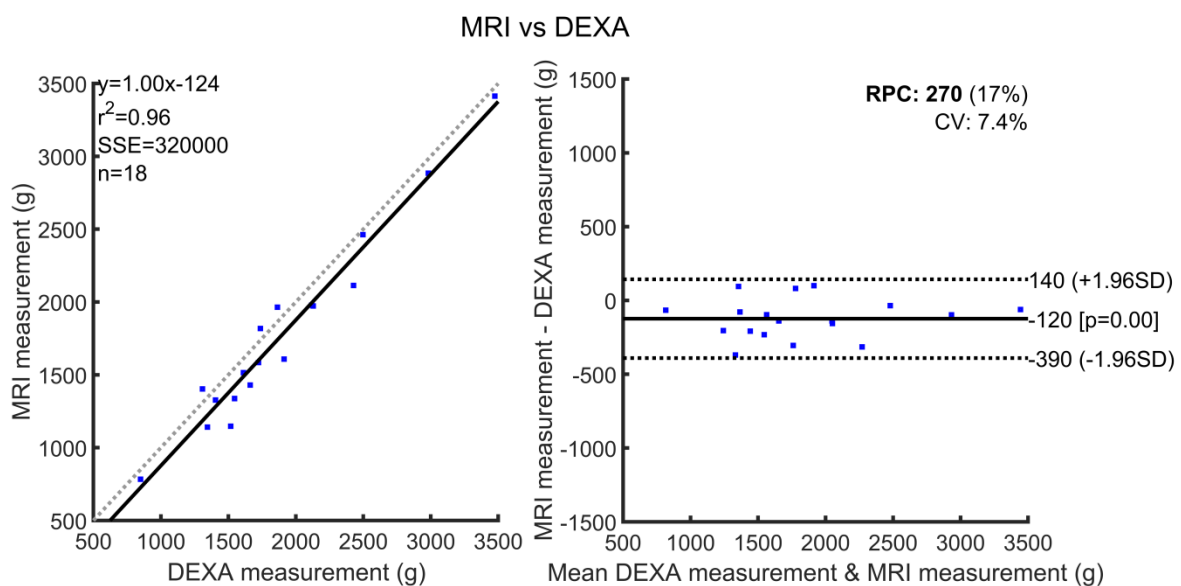
	Baseline	After the overfeeding intervention	Differences
Age	33 ± 2		
Body weight(kg)	79.6 ± 1.6	82.4 ± 1.6	2.6 ± 0.3*** (n = 21)
Body Mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25.2 ± 0.3	26.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1*** (n = 21)
DEXA			
fat mass of whole body (kg)	19.6 ± 1.2	21.2 ± 1.1	1.6 ± 1.1*** (n = 21)
fat mass of android region (kg)	1.85 ± 0.13	2.07 ± 0.57	0.19 ± 0.04** (n = 20, p=0.001)
CSE-MRI			
SAT volume (cm <sup>3</sup> )	1104 ± 74	1191 ± 79	91 ± 22*** (n=20)
VAT volume (cm <sup>3</sup> )	922 ± 104	1070 ± 116	129 ± 31*** (n=20)
TAT volume (cm <sup>3</sup> )	2027 ± 745	2261 ± 765	219 ± 41*** (n=20)
VAT/SAT	0.83 ± 0.08	0.91 ± 0.09	0,06 ± 0,03* (n=20, p=0.020)
liver PDFF	2.70 ± 0.54	4.05 ± 0.87	1.35 ± 0.39** (n=20, p=0.003)
localized liver PDFF	1.73 ± 0.34	3.38 ± 0.77	1.66 ± 0.53** (n=19, p=0.006)

	FA composition of SAT	ndb = 2.43 ± 0.04 nmidb = 0.56 ± 0.02	2.43 ± 0.03 0.55 ± 0.01	0.00 ± 0.01 (n=19, p=0.812) 0.00 ± 0.01 (n=19, p=0.612)
	FA composition of VAT	ndb = 2.20 ± 0.03 nmidb = 0.46 ± 0.02	2.19 ± 0.03 0.44 ± 0.01	-0.01 ± 0.02 (n=19, p=0.512) -0.03 ± 0.01* (n=19, p=0.013)
MRS	liver PDFF	1.20 ± 0.23	3.02 ± 0.31	1.74 ± 0.48** (n=20, p=0.002)
	FA composition of SAT	ndb = 2.48 ± 0.06 nmidb = 0.58 ± 0.03	2.45 ± 0.07 0.57 ± 0.03	-0.05 ± 0.05 (n=20, p=0.381) -0.02 ± 0.03 (n=20, p=0.417)
	FA composition of VAT	ndb = 1.90 ± 0.16 nmidb = 0.37 ± 0.06	2.04 ± 0.11 0.41 ± 0.04	0.19 ± 0.17 (n=15, p=0.290) 0.06 ± 0.06 (n=15, p=0.395)

### 3.1.3.2. Volumes

#### MRI vs DEXA before intervention

On a total of 21 subjects, 18 underwent DEXA scanning on the same device (DEXA, Lunar Prodigy GE Medical Systems) and three on a different one (Discovery A, Hologic, Bedford, MA, USA). Only data from the first 18 subjects were used for the comparison. An excellent correlation between CSE-MRI measurement of TAT and DEXA measurement of android region ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.001$ ) was found with a constant lower value of MRI-based estimate (bias of -120g, Bland-Altman plot figure 3.4). This bias represented 6% in average of the android region mass. The total fat content measured by CSE-MRI considering PDFF of tissues was also highly correlated to DEXA measurement of android region ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.001$ , bias of +96g).



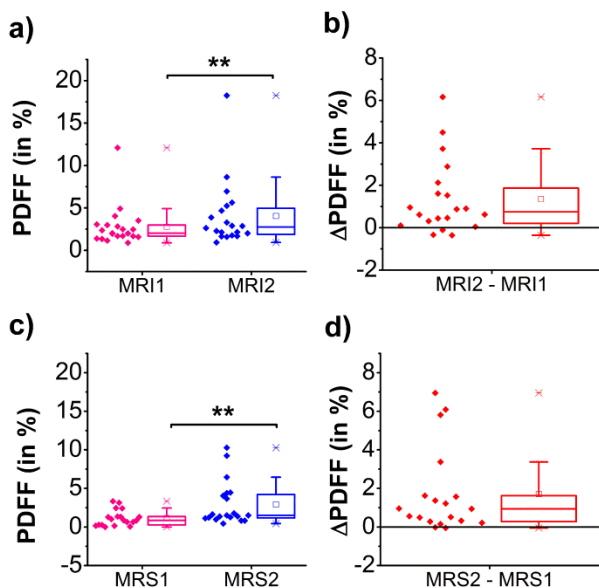
**Figure 3.4:** The total abdominal adipose tissue (TAT) volume delimited by the lumbar vertebrae L2 and L4 was calculated using CSE-MRI. This volume was converted into mass using the assumed density of 0.92 g/cm<sup>3</sup> and compared to the DEXA measurement on android region. The dotted line in the left part of this graph represents the identity line.

### After the overfeeding intervention

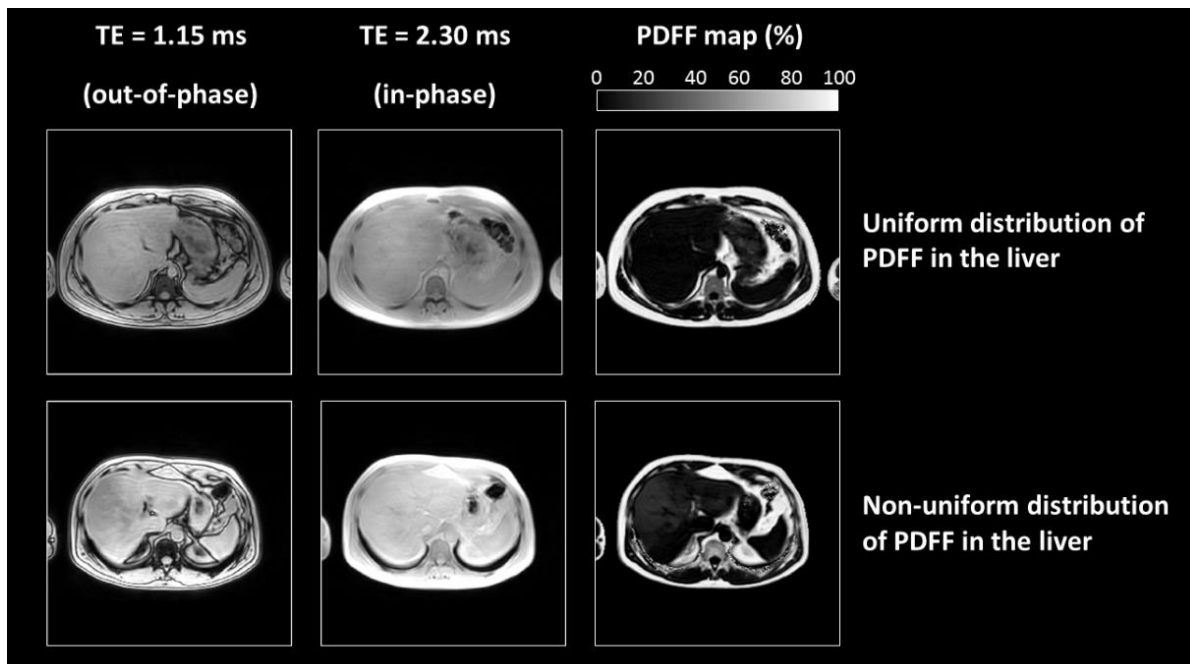
The subjects gained  $2.5 \pm 0.3\text{kg}$ , with a  $1.6 \pm 1.1\text{kg}$  fat mass gain measured by DEXA (table 3.2). SAT, VAT and TAT volumes quantified using CSE-MRI sequence significantly increased between the two examinations ( $+91\text{ cm}^3$ ,  $p<0.001$ ;  $+129\text{ cm}^3$ ,  $p<0.001$ ;  $+219\text{ cm}^3$ ,  $p<0.001$  respectively). A significant increase in fat mass measured by DEXA in android region was also observed ( $+191\text{ g}$ ,  $p=0.001$ ) and was correlated to the CSE-MRI measurements of TAT ( $r=0.80$ ,  $p<0.001$ ,  $n=16$ ). The ratio VAT/SAT also significantly increased after overfeeding ( $+4$ ,  $p=0.020$ ).

#### 3.1.3.3. Fat content in the liver

Hepatic fat content is low in healthy subjects and difficult to detect. In some MRS measurements, fat content could not be detected: 2/20 at the baseline (MRS1). Over the total of 21 subjects at baseline, one subject presented an abnormal level of PDFF in the liver (PDFF $>10\%$ ) based on CSE-MRI measurements (figure 3.5a). Surprisingly, its corresponding MRS measurement indicated a normal level of PDFF (PDFF=3.33%). This subject had a non-homogeneous (figure 3.6) fat content in the liver and the MRS measurement was made in a low-fat region of the liver.



**Figure 3.5:** Dots represent the value of the proton density fat fraction (PDFF) in the liver for each subject and are represented in a boxplot beside dots. Figures a) and b) show CSE-MRI measurements. Figures c) and d) show MRS measurements. In figures a) and c) data before overfeeding (MRI1 and MRS1) are in pink color and data after the overfeeding (MRI2 and MRS2) in blue. In figures b) and d) the difference between the two examinations was illustrated. Paired t-test was performed between MRI1 and MRI2 for the PDFF in the liver. Significant difference between the two examinations was shown by Paired t-test (\*\* p-value < 0.01) and Wilcoxon rank test ( $p<0.001$ ,  $n = 20$ , . The PDFF increased significantly ( $+1.35$ ,  $p = 0.002$  for CSE-MRI measurements;  $+1.74$ ,  $p = 0.002$  for MRS measurements).

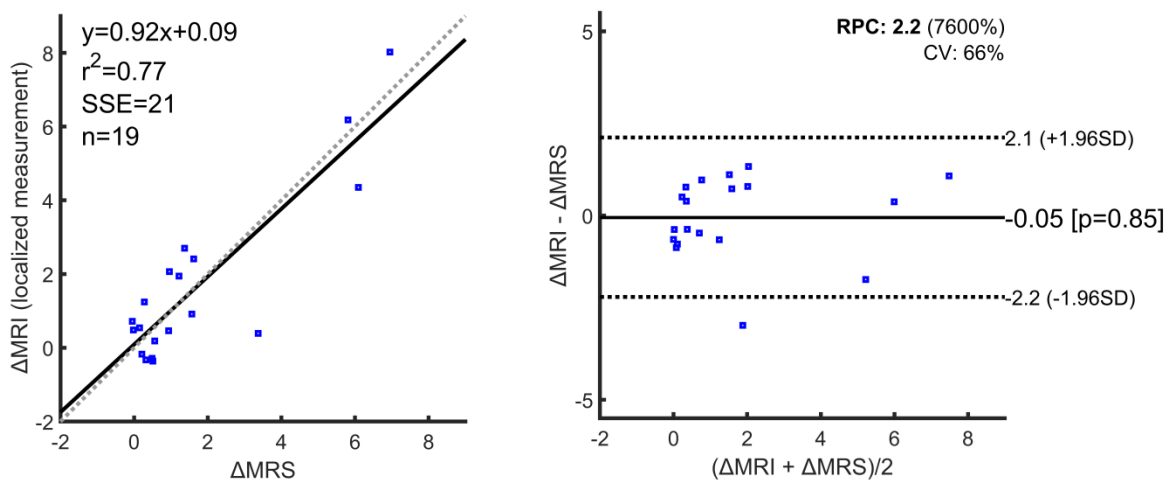


**Figure 3.6:** Two examples of exams with different PDFFF distribution in the liver. 3D MRI acquisition parameters were the following : 8 echoes ( $n \times 1.15$  ms TE with  $n=1, \dots, 8$ ),  $5^\circ$  flip angle, 10.3 ms TR,  $384 \times 420 \times 320$  mm<sup>3</sup> FOV,  $256 \times 256 \times 80$  matrix size, 20.8 s scan time. This acquisition was made in breath-holding. The first (out of phase) and second (in-phase) echoes as well as the PDFFF map are displayed.

#### *Liver PDFFF: MRI vs MRS*

At baseline, the correlation between localized CSE-MRI and MRS measurements was poor ( $r^2 = 0.50$ ,  $y = 1.02x + 0.57$ ). In Addition, the localized CSE-MRI gave larger PDFFF-values (+0.60 percentage points). After the overfeeding, the correlation was improved ( $r^2 = 0.80$ ,  $y = 1.04x + 0.42$ ) with still a larger value of CSE-MRI PDFFF measurements (+0.55 percentage points). Interestingly, even if the CSE-MRI seemed to give larger PDFFF-values in the case of low-fat content, variations of PDFFF between the two examinations measured by MRS or CSE-MRI were found to be very close ( $r^2 = 0.77$ ,  $y = 0.92x + 0.09$ ). Moreover, the bias between these two measurements was small (larger value of localized CSE-MRI +0.05 percentage points, Bland-Altman figure 3.7). The figure 3.7 shows an outlier point with a  $\Delta$ MRS (MRS2-MRS1) PDFFF value at 3.37 and a  $\Delta$ MRI (MRI2-MRI1) PDFFF value at 0.39. We must notify that the two subsequent MRS2 acquisitions of the subject gave significantly ( $p < 0.001$ ) different results: 6.32% at the first acquisition and 2.46% at the second acquisition. If we excluded this first acquisition and kept only the second, the MRS2-MRS1 value would be consistent with other points ( $r^2 = 0.85$ ,  $y = 0.98x + 0.08$ , bias of 0.05).

## PDFF (in %) in liver



**Figure 3.7:** The Bland-Altman left part of this graph shows a good correlation between  $\Delta$ MRI (localized MRI2-MRI1 measurement) and  $\Delta$ MRS (MRS2-MRS1 measurement). The Pearson's coefficient was  $r = 0.88$ ,  $p < 0.001$ . The Bland-Altman in the right part of the graph shows with a little bias of 0.05. The Pearson's coefficient was  $r = 0.88$ ,  $p < 0.001$ .

### Liver PDFF: after the overfeeding intervention

MRS measurements indicated that the PDFF in liver increased significantly (+1.74, paired t-test  $p = 0.002$ ) between the two examinations. Similarly, for CSE-MRI measurements, the PDFF in liver increased significantly (+1.35, paired t-test  $p = 0.002$ ). As shown in the figure 3.5a and 3.5c, data had a non-normal distribution (Shapiro-Wilk test  $p < 0.001$  for MRS1;  $p < 0.001$  for MRS2;  $p < 0.001$  for MRI1;  $p < 0.001$  for MRI2) and a non-parametric test (paired sample Wilcoxon rank test) was performed (same observation: positive difference for MRS2-MRS1  $p < 0.001$  and positive difference for MRI2-MRI1  $p < 0.001$ ).

#### **3.1.3.4. FA composition of VAT and SAT**

Some VAT spectra were not analyzed due to poor quality of spectra (low SNR or high inhomogeneity of B0 field) and were removed from the analyses: 4/20 at baseline and 3/21 after overfeeding. The CSE-MRI data of one subject could not be processed to estimate the FA composition.

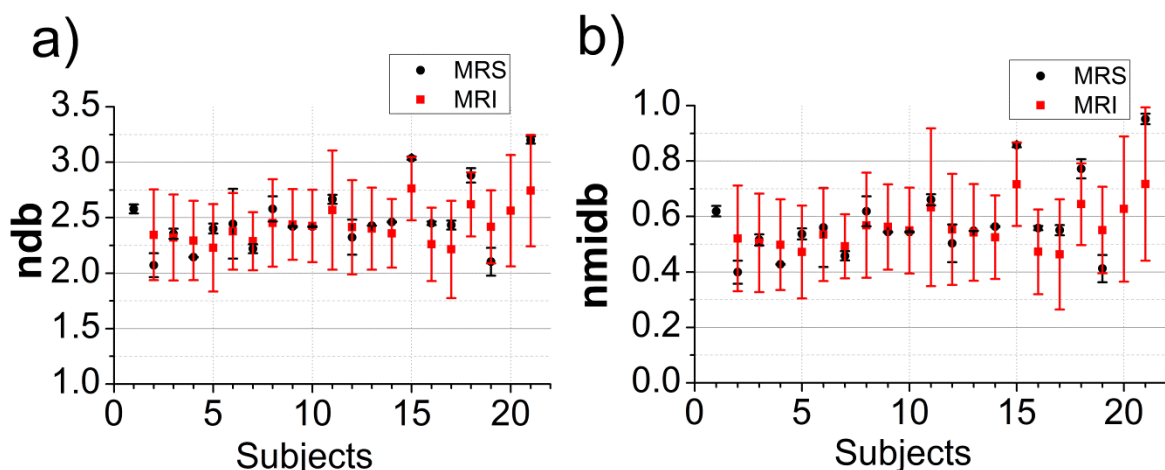
### FA composition: variabilities

For CSE-MRI measurement at the first examination, the intra-subject variability was high with a larger heterogeneity of  $n_{midb}$  values in VAT (mean CV of:  $n_{db}$  28%,  $n_{midb}$  73%,  $n = 20$ ) than in SAT (mean CV of:  $n_{db}$  23%,  $n_{midb}$  55%). A second calculation was performed excluding pixels at the boundaries of the mask and pixels with an estimation of

T2\* under 10 ms and permitted to reduce the intra-subject variability (mean CV of ndb 22%, nmldb 52% n = 20 for VAT and ndb 16%, nmldb 33% n = 20 for SAT). The mean percentage of pixels at the boundaries of the mask was 27% for SAT and 39% for VAT. 17% pixels of SAT and 24% pixels of VAT had an estimated T2\* under 10 ms. The mean CV of MRS measurement was lower in SAT (ndb 3%, nmldb 5%, n = 20) than in VAT (ndb 11%, nmldb 21%, n = 16).

### FA composition: comparison MRS and CSE-MRI (whole volume)

MRS and whole-volume CSE-MRI FA composition estimations were correlated (SAT:  $r = 0.82$ ,  $p < 0.001$  for ndb and  $r = 0.84$ ,  $p < 0.001$  for nmldb,  $n = 19$ ) with a low bias (0.06 95 % CI [-0.32 0.43] for ndb and 0.02 95% CI [-0.15 0.20] for nmldb). It was however difficult to compare these two methods without considering the high spatial variability (intra-subject variability) of CSE-MRI measurements. As illustrated in figure 3.8, the MRS value was included in the range defined by the mean  $\pm$  one standard deviation of CSE-MRI measurements for each subject.



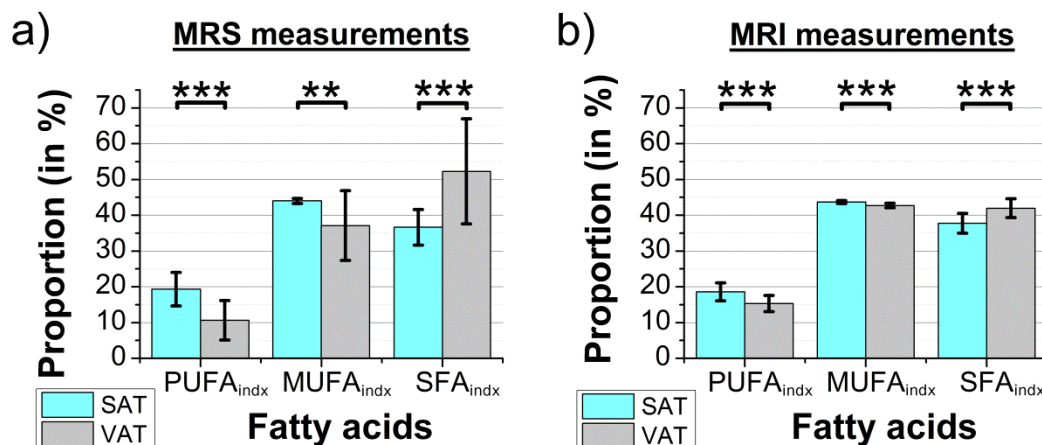
**Figure 3.8:** For each subject ( $n = 21$ , baseline examination, abdominal subcutaneous adipose tissue), the mean value of ndb (a) and nmldb (b) is in red color for CSE-MRI measurement and in black for MRS measurement. The error bars represent the standard deviation in the whole volume studied for CSE-MRI measurements and the mean deviation between the MRS test-retest measurements. The CSE-MRI measurements of subject '1' were missing. The MRS measurements of subject '20' were missing.

### FA composition: SAT and VAT

Regarding CSE-MRI results from the whole segmented volume (L2 to L4) versus the localized-MRS results, the comparison of FA composition of SAT and VAT appeared to be substantially equivalent in average for ndb and nmldb measurements (CSE-MRI SAT vs VAT: ndb =  $2.43 \pm 0.16$  vs  $2.20 \pm 0.15$   $p < 0.001$ , nmldb =  $0.56 \pm 0.07$  vs  $0.46 \pm 0.07$   $p < 0.001$ ; MRS: ndb =  $2.48 \pm 0.29$  vs  $1.90 \pm 0.63$   $p = 0.001$ , nmldb =  $0.58 \pm 0.14$  vs  $0.37 \pm 0.22$



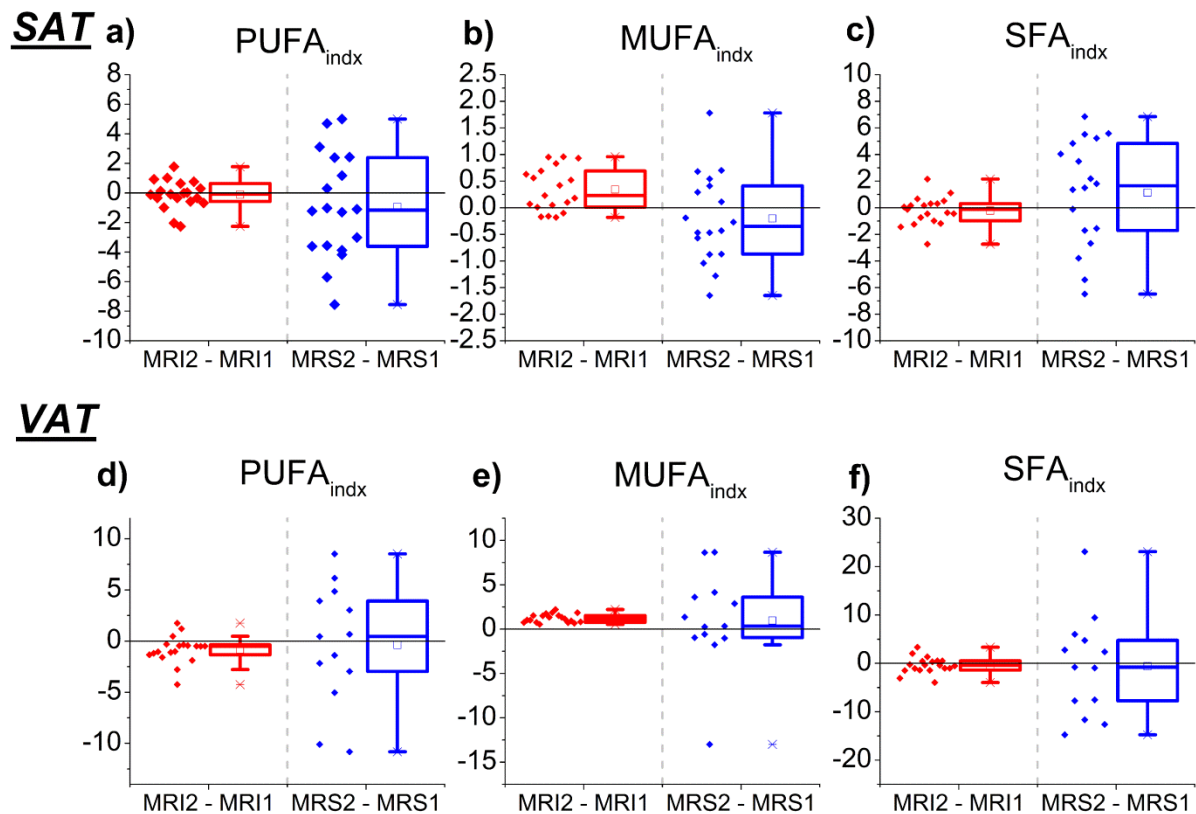
$p = 0.001$ ) and for PUFA<sub>indx</sub>/MUFA<sub>indx</sub>/SFA<sub>indx</sub> measurements (Figure 3.9). In both cases, paired t-tests showed significant difference between SAT and VAT FA composition ( $p < 0.001$  for CSE-MRI measurements and  $p < 0.01$  for MRS measurements). The inter-subject variability was higher in localized-MRS measurements than in the CSE-MRI measurements.



**Figure 3.9:** Bars represent the mean value of PUFA<sub>indx</sub> (resp. MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub>) and error bars represent the standard deviation (inter-subject variability) for the tissue VAT (visceral adipose tissue) and SAT (abdominal subcutaneous adipose tissue) measured a) by MRS and b) by CSE-MRI method. Paired t-tests were performed between values from SAT against values from VAT for PUFA<sub>indx</sub>, MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub> measurements. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### FA composition: change between the two examinations

The same trend for the variations of all the FA composition parameters was observed based on both CSE-MRI and MRS measurements for VAT (figure 3.10). The low inter-subject variability of CSE-MRI measurement permitted to detect significant variation of adipose tissue composition whereas MRS measurement did not (VAT MUFA + 1.22 percentage points ( $p < 0.001$ ) for CSE-MRI, + 0.96 percentage points ( $p = 0.318$ ) for MRS).



**Figure 3.10:** Dots represent the difference between the baseline measurement and after the overfeeding. The inter-subject of MRS measurement was higher than CSE-MRI measurement. Paired t-tests were performed between the two examinations (SAT: PUFA<sub>indx</sub>/MUFA<sub>indx</sub>/SFA<sub>indx</sub> - 0.12 (p = 0.356)/0.34 (p = 0.001)/-0.23 (p = 0.356) n = 19 for CSE-MRI and -0.94 (p = 0.416)/-0.20 (p = 0.314)/ 1.15 (p = 0.354) n = 18 for MRS; VAT: -0.84 (p = 0.012)/1.22 (p < 0.001)/-0.38 (p = 0.349) n = 19 for CSE-MRI and -0.38 (p = 0.604)/0.96 (p = 0.318)/ -0.58 (p = 0.443) n = 13 for MRS).

### FA composition: GC-MS analysis

Thirteen samples of SAT were analyzed using gas chromatography (7 before and 6 after the overfeeding intervention). Results were expressed as molar percentage and are presented in table 3.3. Measurements by GC-MS were considered as reference.

	Fatty acid	Mean	SD
SFA (%)	C12	0.80	0.17
	C14	4.99	0.48
	C15	0.47	0.03
	C16	27.40	1.31
	C18	4.32	0.63
	C20	0.12	0.02
MUFA	C14:1	0.49	0.12

**Table 3.3:** Molar percentage of the different fatty acid of human subcutaneous adipose tissue determined by gas chromatography (n = 13). PUFA<sub>indx</sub>, MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub> were computed using ndbGC and nmdbGC.

(%)	C16:1	4.46	1.14
	C18:1n9t	0.47	0.08
	C18:1n9c	42.15	1.3
	C18:1n7	1.75	0.09
	C20:1	0.45	0.03
<b>PUFA (%)</b>	C18:2n6c	11.09	2.32
	C20:2	0.15	0.01
	C18:3n3	0.68	0.18
	C20:4n6	0.20	0.05
<b>PUFA (%)</b>		12.12	2.44
<b>MUFA (%)</b>		49.78	2.27
<b>SFA (%)</b>		38.10	1.98
<b>ndb<sub>GC</sub></b>		2.25	0.12
<b>nmidb<sub>GC</sub></b>		0.40	0.08
<b>CL<sub>GC</sub></b>		17.10	0.06
<b>PUFA<sub>indx</sub> (%)</b>		13.21	2.57
<b>MUFA<sub>indx</sub> (%)</b>		48.69	2.37
<b>SFA<sub>indx</sub> (%)</b>		38.10	1.98

Good correlations were found between GC-MS and CSE-MRI measurements (for ndb:  $r = 0.84$ ,  $y = 0.76x + 0.40$ ,  $p = 0.001$ ; for nmidb:  $r = 0.66$ ,  $y = 0.88x - 0.09$ ,  $p = 0.020$ ). However CSE-MRI measurements overestimated ndb (Bland-Altman bias = 0.17 percentage points, 95% CI [0.01;0.34]) and nmidb (Bland-Altman bias=0.16 percentage points, 95% CI [0.04;0.27]). Better correlations were found between GC-MS and MRS measurements (for ndb:  $r = 0.83$ ,  $y = 0.31x + 1.47$ ,  $p < 0.001$ ; for nmidb:  $r = 0.74$ ,  $y = 0.36x + 0.19$ ,  $p = 0.006$ ) however the bias was larger. MRS measurements overestimated ndb (bias = 0.24 percentage points, 95% CI [-0.22;0.70], Bland-Altman) and nmidb (bias = 0.19 percentage points, 95% CI [- 0.04;0.42], Bland-Altman).

### 3.1.4. Discussion

Consistent with the literature (Silver et al. 2013), we found that CSE-MRI-based fat mass measurements of android region is strongly correlated with DEXA measurements.

However, a small bias was observed with slight underestimation of TAT volume with CSE-MRI measurements. The DEXA measurement is a 2D measurement and does not permit to distinguish VAT, SAT and other ectopic fat like bone marrow and intramuscular adipose tissue. The automated segmentation processing based on CSE-MRI images enabled to separate VAT from SAT. Thus, muscles and bone marrow were excluded from VAT mask by a threshold empirically defined at 55% using the PDFFF mapping. This exclusion could explain the difference in CSE-MRI and DEXA measurements as when we considered the PDFFF of muscles, vertebrae and VAT in the calculation of fat content, the bias reduced. To go further in the segmentation of different adipose tissue depots, some studies (Sadananthan et al. 2015; Hamilton et al. 2017) differentiated the deep (DSAT) from the superficial (SSAT) subcutaneous adipose tissue in the abdominal region. This segmentation of DSAT and SSAT is very challenging because the fascia superficial separating these tissues appears subtle and discontinuous and need a fine resolution (~1.25 mm). The present in-plane resolution was due to a compromise between an acquisition time compatible with breath-holding and the size of the covering volume (320 mm in the head-foot direction in this study) to give a good SNR which is an essential parameter to estimate the FA composition (i.e. proportions of PUFA<sub>indx</sub>, MUFA<sub>indx</sub> and SFA<sub>indx</sub>). From a metabolic point of view, GC analysis of SSAT and DSAT in a large cohort shows homogenous FA composition in the two adipose tissue depots (Petrus et al. 2017).

Liver PDFFF results were consistent with the literature (Zand et al. 2015; Tyagi et al. 2015; Achmad et al. 2015), with a good correlation established between MRS and CSE-MRI measurements. However, some studies (Zand et al. 2015; Tyagi et al. 2015; Achmad et al. 2015) provided a better correlation. It should be noted that the range of values was larger in these papers (0 – 40 % (Achmad et al. 2015; Zand et al. 2015; Tyagi et al. 2015)) than in the present paper (0 – 12 %). Especially, it is challenging to accurately estimate very low fat content in liver. Here, we demonstrated that even if the PDFFF measurement methods with CSE-MRI or MRS were different, the difference between the two PDFFF measurements (before and after the overfeeding) was equivalent with the two methods. In this study, no T2 correction was applied on the calculation of fat content in the liver for MRS measurement. In addition, MRI method include by a priori knowledge eight fat spectral component in the quantification model, that was not the case for MRS since fat quantities were too low in this study. These could explain why the MRS measurement gave underestimated values compared to CSE-MRI measurement. On the other hand, the CSE-MRI PDFFF estimate could be affected by the low SNR.

The lipid quantification by CSE-MRI could be interesting in longitudinal clinical studies, as an indirect marker of AT metabolism. Here, the average on the whole segmented volume (between L2-L4) seemed to give results consistent with the literature. Machann et al. (Machann et al. 2017) reported similar results even if they computed different FA composition indexes: the polyunsaturated index (PUI = diacyl-methyl ratio) and the unsaturated index (UI = olefinic-methyl ratio), VAT was composed by 14.9%/48.9%/36.2% of PUFA<sub>indx</sub>/MUFA<sub>indx</sub>/SFA<sub>indx</sub> (vs 15.3%/42.7%/43.0% in our study), SAT was composed by 16.2%/56.6%/27.2% (vs 18.6%/43.7%/37.7% in our study). Other studies reported higher values of nmdb both using MRS method (0.75 SCAT calf (Ren et al. 2008), 0.687/0.745 for VAT/DSAT (Hamilton et al. 2017), 0.71 for SCAT leg (Peterson and Månsson 2013), 0.79/0.81 for VAT/DSAT (Bydder, Girard, and Hamilton 2011) than 0.37/0.58 for VAT/SAT in our study) and with MRI method (0.836/0.936 for VAT/SAT (Benjamin Leporq et al. 2014), 0.71/0.73 for VAT/DSAT (Bydder, Girard, and Hamilton 2011), 0.74 for SCAT leg (Peterson and Månsson 2013) than 0.46/0.56 for VAT/SAT in our study) which led to an estimation of PUFA superior to 20%. However, several gas chromatography analysis have quantified a lower content of PUFA (12.3% (Lundbom et al. 2010), 14.4% (Field, Angel, and Clandinin 1985), 16.5% (Hodson, Skeaff, and Fielding 2008), 14.1% (Rosqvist et al. 2014)) and lower nmdb (0.45 (Field, Angel, and Clandinin 1985), 0.50 (Hodson, Skeaff, and Fielding 2008), 0.63 (Garaulet et al. 2006)) which was more consistent with our present results. It should also be noted that the PUFA<sub>indx</sub> calculation made from nmdb, was not an absolute quantification but a coherent index of polyunsaturation, leading to consistent results when the most frequently identified PUFA is di-unsaturated FA. It could be possible to quantify the proportion of PUFA more precisely by calculating the proportion of omega-3 (Lundbom et al. 2009; Fallone, McKay, and Yahya 2018; Škoch, Tošner, and Hájek 2014) and correcting the present calculation but it does not permit to know exactly the number of double bonds per chain.

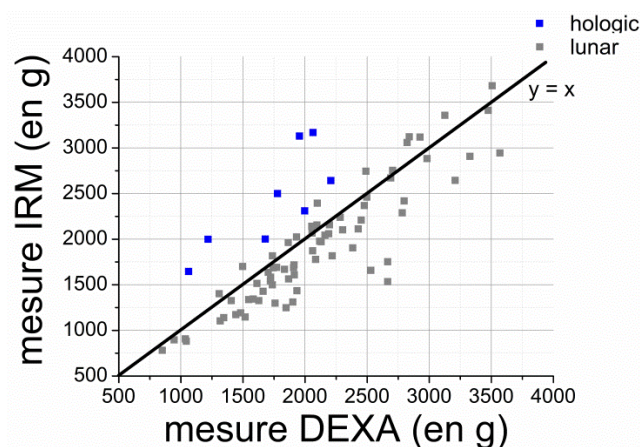
The validation of lipid quantification by CSE-MRI using MRS measurement is a difficult task. As expected, the lipid quantification by MRS is challenging and results depend on the B0 field heterogeneities (Hamilton et al. 2017), the MRS sequences (Hamilton et al. 2009), the acquisition parameters (long TE or short TE) (Lundbom et al. 2010) and the fitting approaches (Mosconi et al. 2014). It is therefore difficult to use it as reference. On the other hand, a gold standard like gas chromatography-mass spectrometry analysis is difficult to perform on human volunteers, for ethical reasons only subcutaneous adipose tissue can be analyzed. In this study, good correlations were found between MRS and CSE-MRI

measurement, MRS and GC-MS measurements and between CSE-MRI and GC-MS measurements. However, the NMR methodologies gave biased results compare to GC-MS methodology. The CSE-MRI and MRS fitting approach used strong constraint on a relation between  $ndb$  and  $nmidb$  (Benjamin Leporq et al. 2014; Nemeth et al. 2018) to improve the repeatability of measurements, however this constraint provided biased results and not absolute quantification. Therefore, the good correlation between GC-MS and NMR methodologies is already an important result, even if, a comparative study using more sample should be necessary. The spatial non-uniformity of  $nmidb$  was larger in VAT than in SAT. This high spatial variability could be due to a sensitivity of CSE-MRI FA composition measurements to local field inhomogeneity as the coefficient of variation reduced when we removed pixels located at fat-air interface. This local field inhomogeneity is due to high contribution of internal field as regard to fat-tissue interface where susceptibility gradient is strong. To increase spatial resolution may probably minimize this effect. Alternatively, to provide more consistent measurements, it is possible to suppress these voxels in the segmentation pipeline such as proposed in this study. Moreover, VAT tissue could be more impacted by local field inhomogeneity due to the presence of air in the gut. In localized area, this sensitivity to local field heterogeneities led to erroneous values of CSE-MRI measurements. For the study of localized area, localized-MRS seemed to still be the best method thanks to shim methods allowing to homogenize locally the magnetic field. Visual analysis of spectrum permits to validate results with consistent fitting approach. Moreover, in the literature, only methods of spectroscopy make the quantification of omega-3 possible (Lundbom et al. 2009; Fallone, McKay, and Yahya 2018; Škoch, Tošner, and Hájek 2014). A limitation of our study concerned the design of the overfeeding. This was a short term 31-days overfeeding, and as the half-life of subcutaneous adipose tissue fatty acids is around 6 to 9 months (Hodson, Skeaff, and Fielding 2008), the overfeeding may have been too short to detect a change in SAT fatty composition with the diet.

To conclude, significant increase in fat distribution in VAT, SAT and liver were measured by DEXA, MRS and CSE-MRI measurements after an experimental overfeeding. FA composition changes (more precisely the MUFA proportion) of the adipose tissue were also observed by CSE-MRI measurements. The use of a single 3D CSE-MRI sequence associated with a dedicated post processing method is a suitable protocol to follow several parameters linked to adipose tissue changes. This NMR protocol could be used in future work to evaluate non-invasively the impact of nutrition on adipose tissues and liver.

## 3.2. Effet des polyphénols couplés à la surnutrition

L'inclusion des sujets a débuté en février 2014 et s'est terminée en décembre 2016. Parmi les 42 volontaires masculins inclus, seulement 1 sujet du groupe « polyphénol » a quitté le protocole après le premier examen d'imagerie et de spectroscopie. La répartition des sujets était équitable : 21 sujets dans chaque groupe. Le recrutement s'est étalé dans le temps et, malheureusement, nous avons dû faire face au dysfonctionnement d'un appareil (panne du DEXA) ou à des mises à jour de logiciel (IRM) qui ont perturbé la mesure et l'analyse de certaines données. Pour assurer la continuité des examens durant la panne du DEXA (Lunar Prodigy GE Medical Systems), des sujets ont été scannés avec un autre dispositif situé à l'hôpital Edouard Herriot (Discovery A, Hologic, Bedford, MA, USA). Cependant, comme vu dans le chapitre 1, la fraction de masse grasse estimée dépend du dispositif utilisé. Ceci s'est confirmé sur nos données (voir figure 3.11). En comparant avec les mesures IRM sur la région android, les points en bleu (dispositif 'hologic') semblent suivre une autre relation que sur le premier dispositif. En effet, la proportion de graisse semble être sous-estimée en DEXA par rapport à l'autre dispositif pour des valeurs IRM équivalentes.

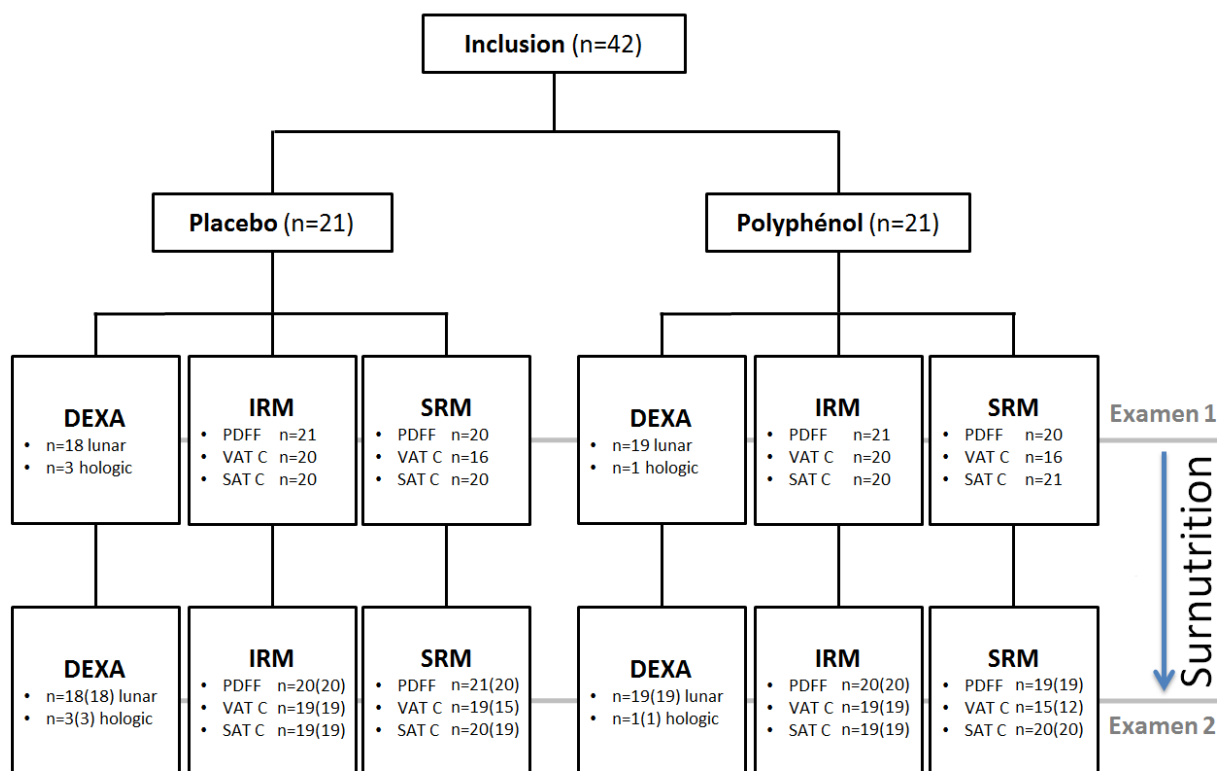


**Figure 3.11 : Masse grasse mesurée à partir de donnée IRM en fonction des mesures réalisées en DEXA**

La mise à jour de l'IRM a également entraîné un changement du format de fichier à exploiter (format des images avant la mise à jour en .PAR/.REC et après la mise à jour en .xml/.REC), ce qui nous a obligé à réadapter toutes les routines mises en place au laboratoire.

L'organigramme (figure 3.12) répertorie le nombre de résultats disponibles pour chaque mesure (DEXA, IRM et SRM) pour l'examen 1 (avant la surnutrition) et pour l'examen 2 (après la surnutrition). Pour les données de l'examen 2, n est exprimé sous la

forme « nombre de données utilisables (nombre de sujets ayant des données utilisables à l'examen 1 et 2) ».



**Figure 3.12 :** Récapitulatif du nombre de données (n) selon l'examen (« 1 » avant la surnutrition et « 2 » après), les deux groupes (Placebo ou polyphénol), la méthode utilisée (DEXA, IRM ou SRM) et de la mesure réalisée. « PDFF » représente le nombre de cartographies en densité de proton obtenues. « VAT C » ou « SAT C » font référence à l'estimation de la proportion des types d'acide gras pour respectivement le tissu adipeux viscéral et sous-cutané. Pour les données de l'examen 2, n est exprimé sous la forme « nombre de données utilisables (nombre de sujets ayant des données utilisables à l'examen 1 et 2) ».

### Statistiques

La normalité des distributions a été vérifiée pour chaque mesure. Un test de Student (t-test) a été utilisé pour chaque comparaison deux à deux (avec correction de Bonferroni des p-valeurs) entre le groupe placebo et polyphénol. Un test de Student (t-test) pour données appariées a été utilisé pour comparer les résultats entre le premier et le deuxième examen. Dans le cas de distribution non-normale, un test de Kolmogorov-Smirnov (K-S test) a aussi été effectué en plus du t-test. La valeur SEM (l'erreur type) est calculée comme l'écart-type standard divisé par la racine du nombre de valeurs observées.

### 3.2.1. Données anthropométriques

Le tableau 3.4 résume les données anthropométriques des sujets de l'étude poly-nut avant et après la surnutrition. La valeur p résulte d'un t-test comparant les données du groupe



placebo et du groupe polyphénol après la surnutrition. Nous observons des effets significatifs de la surnutrition pour les deux groupes dont : une prise de masse totale d'environ 2,6 kg, une augmentation de la masse grasse mesurée en DEXA ainsi que du volume de graisse abdominale mesuré par IRM. Aucun changement significatif n'est observé pour le rapport tour de taille sur tour de hanche (RTH). Les polyphénols n'ont pas eu d'impact sur la prise de poids, la répartition masse grasse/ masse maigre, l'augmentation de VAT et de SAT car toutes les valeurs de p sont supérieures à 0,05. Cependant, le rapport VAT/SAT est intéressant car il montre une différence entre le groupe placebo et polyphénol. En effet, nous observons une augmentation significative de ce rapport pour le groupe placebo alors qu'il reste stable pour le groupe polyphénol. Ceci pourrait s'interpréter comme une tendance ( $p = 0,051$ ) des polyphénols à favoriser l'accumulation de graisse dans le tissu adipeux sous-cutané (SAT).

**Tableau 3.4 : Paramètres anthropométriques des sujets ayant reçu le traitement placebo et polyphénols avant et après surnutrition sous la forme moyenne  $\pm$  SEM.**

	Placebo						p
	Av.	Ap.	Différence	Av.	Ap.	Différence	
masse (kg)	79,6 $\pm$ 1,6	82,4 $\pm$ 1,6	2,6 $\pm$ 0,3***	80,2 $\pm$ 1,6	82,7 $\pm$ 1,7	2,5 $\pm$ 0,3***	0,934
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,2 $\pm$ 0,5	26 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,1***	25,3 $\pm$ 0,5	26,1 $\pm$ 0,54	0,8 $\pm$ 0,1***	0,934
RTH	0,91 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,01	0 $\pm$ 0,01 (a)	0,91 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01(c)	0,471
%masse maigre (DEXA)	76 $\pm$ 1,2	74,7 $\pm$ 1,1	-1,3 $\pm$ 0,3***	74,2 $\pm$ 1,3	72,8 $\pm$ 1,4	-1,4 $\pm$ 0,3***	0,900
%masse grasse (DEXA)	24 $\pm$ 1,2	25,3 $\pm$ 1,1	1,3 $\pm$ 0,3***	25,8 $\pm$ 1,3	27,2 $\pm$ 1,4	1,4 $\pm$ 0,3***	0,900
vol VAT (cm <sup>3</sup> )	922 $\pm$ 104	1070 $\pm$ 116	129 $\pm$ 31***	924 $\pm$ 83	997 $\pm$ 104	89 $\pm$ 30**(d)	0,355
vol SAT (cm <sup>3</sup> )	1104 $\pm$ 74	1191 $\pm$ 81	91 $\pm$ 22***	1173 $\pm$ 86	1293 $\pm$ 107	112 $\pm$ 23***	0,512
vol TAT (cm <sup>3</sup> )	2027 $\pm$ 162	2261 $\pm$ 171	219 $\pm$ 41***	2097 $\pm$ 136	2290 $\pm$ 176	200 $\pm$ 44***	0,759
VAT/SAT	0,83 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,09	0,06 $\pm$ 0,03*(b)	0,82 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,07	0 $\pm$ 0,02 (e)	0,051

a :  $p=0,612$  ; b :  $p=0,020$  ; c :  $p=0,166$  ; d :  $p=0,008$  ; e :  $p=0,871$  \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$

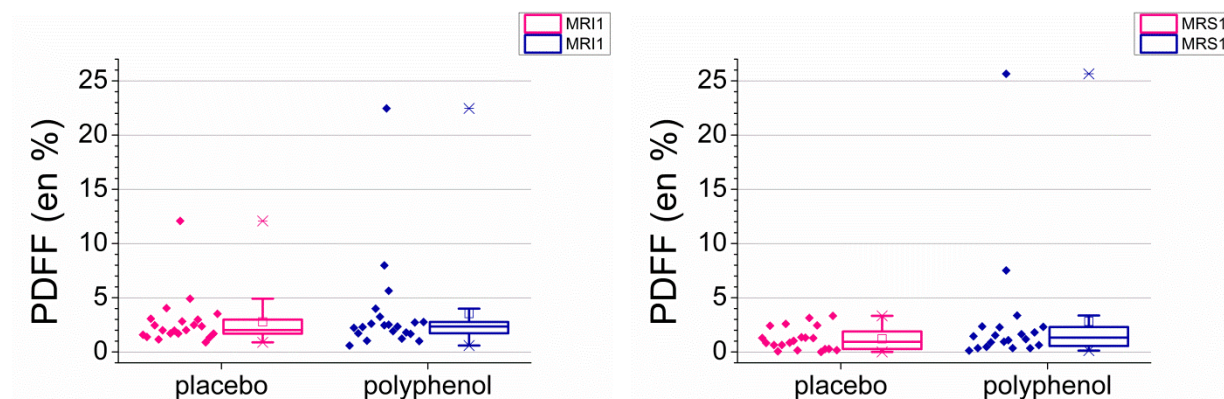
### 3.2.2. Effet sur le foie

Au niveau du foie, nous avons mesuré la quantité de graisse en utilisant la fraction de graisse en densité de proton (PDFF) à la fois à partir de mesures IRM et SRM.

#### PDFF avant la surnutrition

Sur l'ensemble des sujets, deux ont une valeur de PDFF anormale pour des sujets sains (figure 3.13), c'est-à-dire supérieur à 10%, pour les mesures IRM et seulement une pour les mesure SRM. Ces deux valeurs entraînent une distribution non-normale (test de Shapiro-

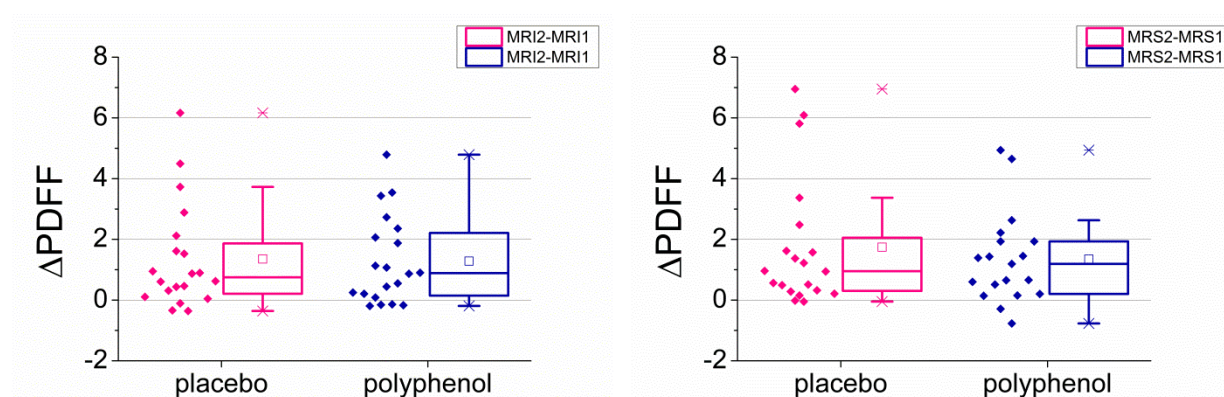
Wilk ; placebo  $p < 0,001$  pour mesure IRM et  $p = 0,026$  pour la mesure SRM ; polyphénol  $p < 0,001$  pour mesure IRM et  $p < 0,001$  pour la mesure SRM). Aucune différence significative n'est observée si on compare les valeurs de PDFF des deux groupes au premier examen que ce soit avec les mesures IRM (t-test  $p = 0,506$ , K-S test  $p = 0,987$ ) ou avec les mesures SRM (t-test  $p = 0,222$ , K-S test  $p = 0,571$ ).



**Figure 3.13 : Mesure IRM (à gauche) et SRM (à droite) de la PDFF dans le foie au premier examen avant la surnutrition.**

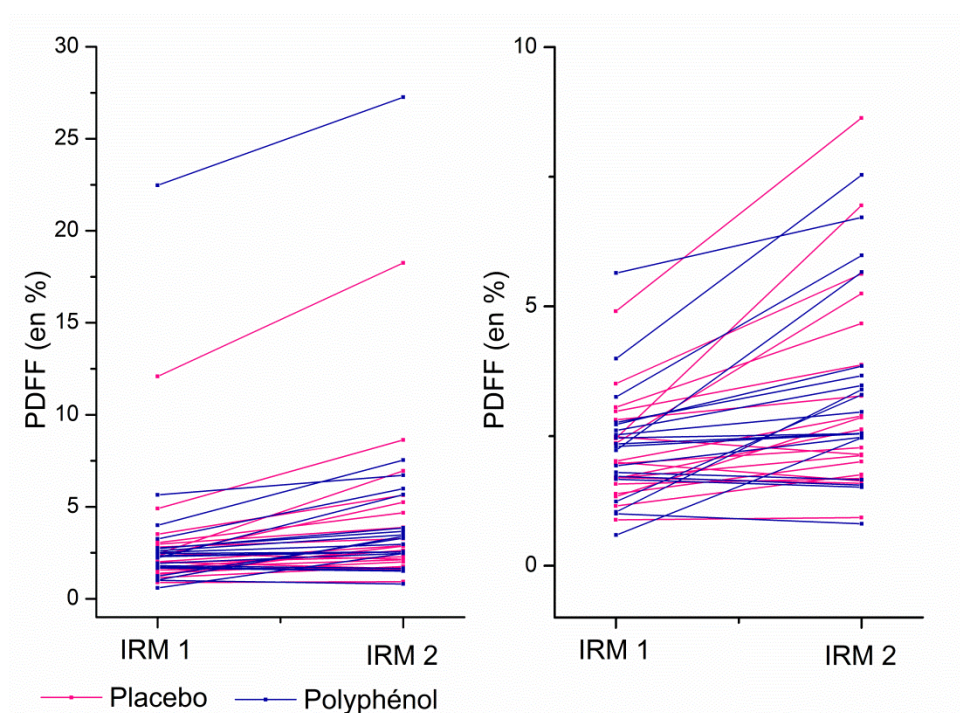
### PDFF après la surnutrition

Après la surnutrition, nous observons une augmentation significative des valeurs de PDFF dans le foie pour les deux groupes. Cependant, aucune différence n'est trouvée entre les deux groupes à l'issu de la surnutrition ni sur les mesures IRM (t-test,  $p = 0,893$  ; K-S test,  $p = 0,999$ ) ni sur les mesures SRM (t-test,  $p = 0,513$  ; K-S test,  $p = 0,936$ ). Nous pouvons opérer une transformation logarithmique des données pour les rendre normales. La même observation est faite que ce soit au premier ou au second examen, avec les mesures IRM ou SRM.



**Figure 3.14 : Différences des mesures de PDFF réalisées en IRM (à gauche) et en SRM (à droite) dans le foie avant et après surnutrition pour les groupes placebo et polyphénol.**

Cependant, ici il est aussi intéressant d'étudier la variance. En effet, si nous regardons l'évolution sujet par sujet (figure 3.15), la pente des droites ne semble pas être identique pour chaque individu. Avec un test d'égalité des variances de Fisher, nous montrons que la variance est significativement plus élevée au deuxième examen par rapport au premier pour le groupe placebo (IRM  $p = 0,030$  ; SRM  $p < 0,001$ ) ce qui n'est pas le cas pour le groupe polyphénol (IRM  $p = 0,400$  ; SRM  $p = 0,462$ ). Cette observation est aussi valide quand les deux valeurs extrêmes sont exclues de l'analyse (placebo : IRM  $p = 0,003$  ; SRM  $p < 0,001$ ; polyphénol : IRM  $p = 0,726$  ; SRM  $p = 0,989$ ). Ceci montre que même si en moyenne tous les sujets ont stocké de la graisse dans le foie, le groupe placebo a un stockage plus hétérogène (certains sujets ont stocké plus de graisse que d'autre).



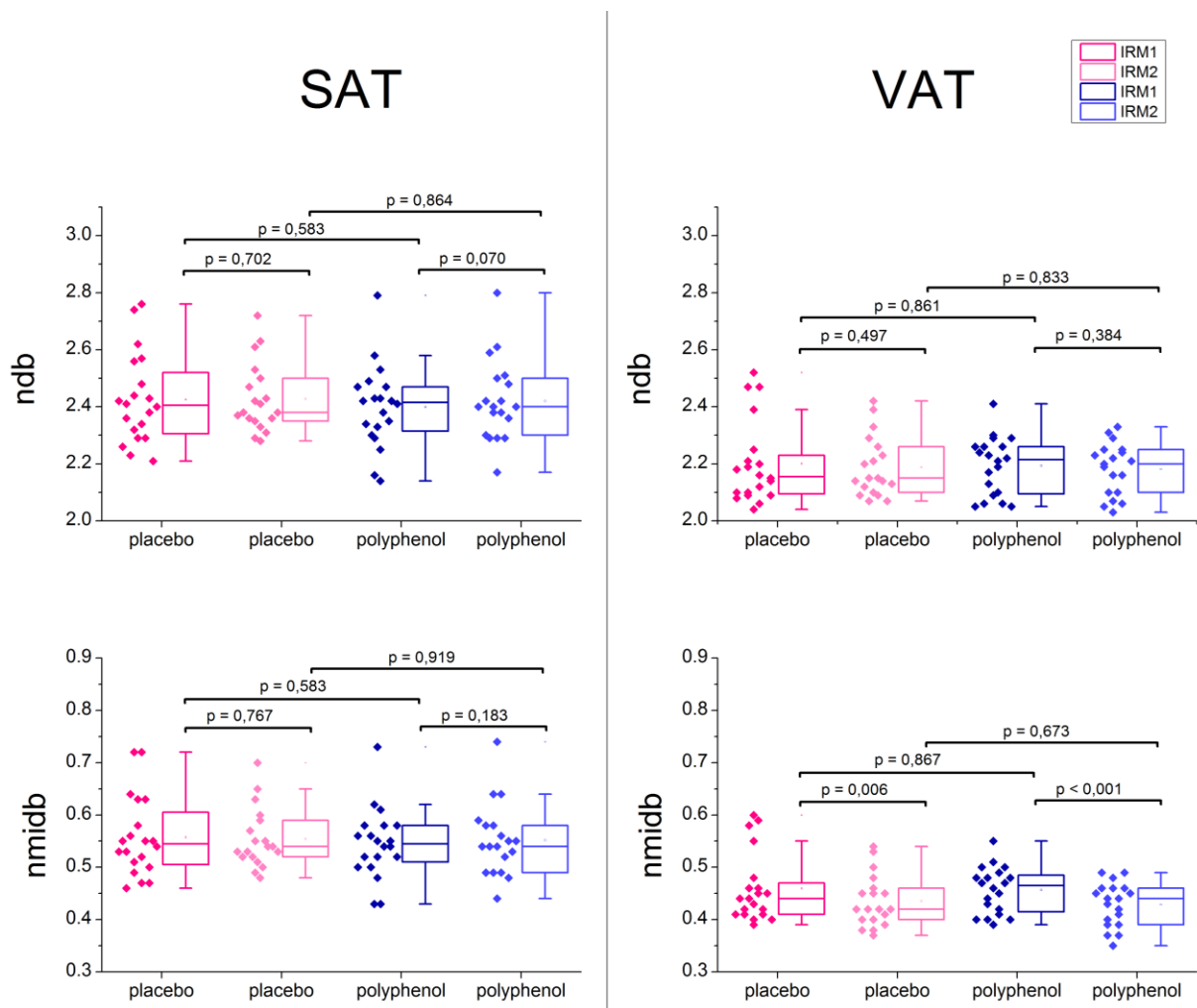
**Figure 3.15 :** Evolution sujet par sujet de la PDFF dans le foie avant (IRM 1) et après (IRM 2) la surnutrition.

### 3.2.3. Effet sur la composition lipidique des tissus adipeux

Au niveau de la composition lipidique des tissus adipeux, nos deux paramètres d'intérêt sont le nombre moyen de double liaison par chaîne de triglycéride (*ndb*) et le nombre moyen de méthylène interrompant deux doubles liaisons (*nmidb*).

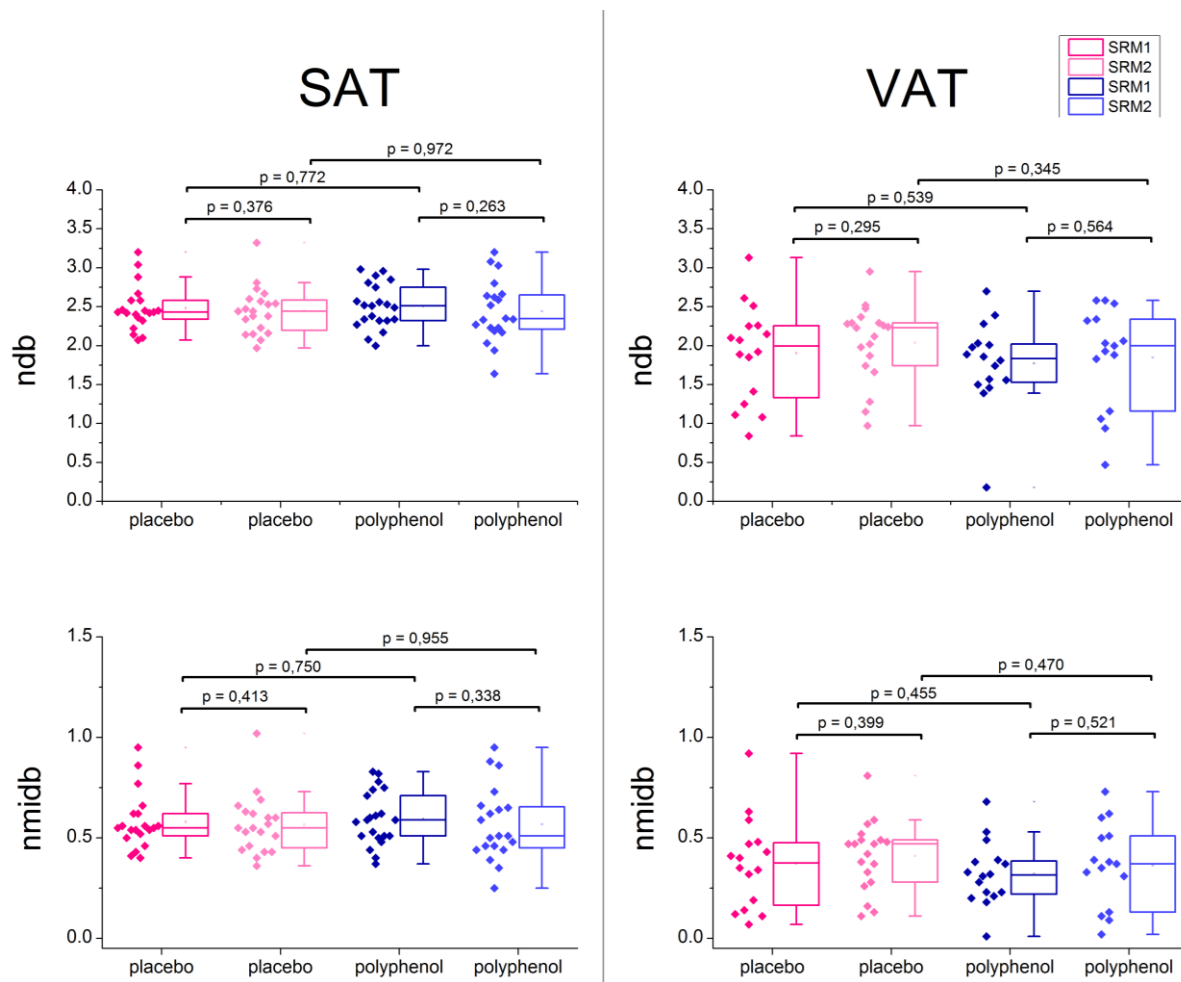
Pour les mesures IRM, nous observons une baisse significative des *nmidb* dans le tissu VAT pour les deux groupes (figure 3.16, - 0,03  $p = 0,006$  pour le groupe placebo et - 0,03

$p < 0,001$  pour le groupe polyphénol). Aucune différence significative n'est trouvée entre les deux groupes.



**Figure 3.16 : Mesure par IRM de la composition lipidique du tissu adipeux sous-cutané (SAT) et viscéral (VAT) pour les groupes placebo et polyphénol avant et après la surnutrition. Les comparaisons sont faites avec des t-test pour des données appariées (avant et après la surnutrition).**

Avec les mesures SRM, nous observons sur la figure 3.17 une légère baisse de *ndb* et *nmidb* durant la surnutrition qui est plus marquée pour le groupe polyphénol dans le tissu adipeux sous-cutané (SAT). Cependant, nous concluons donc à aucune différence significative (figure 3.17).



**Figure 3.17 : Mesure par SRM de la composition lipidique du tissu adipeux sous-cutané (SAT) et viscéral (VAT) pour les groupes placebo et polyphénol avant et après la surnutrition. Les comparaisons sont faites avec des t-test pour des données appariées (afin de comparer avant et après la surnutrition).**

Sur les 20 analyses totales de chromatographie en phase gazeuse (GC-MS), 3 données avant la surnutrition et 4 après sont disponibles pour le groupe polyphénol et 7 avant et 6 après pour le groupe placebo. Parmi ces analyses, 2 sujets du groupe polyphénol et 3 sujets du groupe placebo ont eu des analyses GC-MS avant et après la surnutrition (tableau 3.5). Aucune différence n'est observée entre les deux groupes. Nous observons une légère baisse, mais significative, des PUFA dans le tissu SAT grâce à la GC-MS (nmldb - 0,01,  $p = 0,006$ , PUFA - 0,33 point,  $p = 0,008$ ). Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution à cause du faible nombre de valeurs.

**Tableau 3.5 : Composition lipidique des chaînes de triglycéride du tissu adipeux sous-cutané estimée par GC-MS chez 5 sujets. PP : sujet ayant eu une gélule de polyphénol et PCB sujet ayant eu une gélule de placebo (lactose).**

	SFA	MUFA	PUFA	ndb	nmidb	CL	SFA	MUFA	PUFA	ndb	nmidb	CL
<b>PP 1</b>	38,43	51,14	10,43	2,19	0,34	17,01	38,82	51,09	10,09	2,17	0,33	16,99
<b>PP 2</b>	34,03	52,02	13,95	2,43	0,45	17,22	34,98	51,50	13,52	2,39	0,44	17,20
<b>PCB 1</b>	40,00	50,65	9,35	2,10	0,30	17,04	39,62	51,19	9,19	2,11	0,30	17,04
<b>PCB 2</b>	40,11	45,87	14,01	2,25	0,46	17,13	40,25	46,25	13,49	2,23	0,44	17,13
<b>PCB 3</b>	36,75	51,84	11,41	2,27	0,37	17,11	36,93	51,85	11,22	2,26	0,37	17,10

### 3.2.4. Discussion

Les polyphénols lors de la surnutrition pourraient avoir un effet sur le stockage des graisses dans l'organisme en favorisant son accumulation dans le tissu adipeux sous-cutané plutôt que dans le tissu adipeux viscéral, ce qui aurait un effet protecteur vis à vis du syndrome métabolique (Kwon, Kim, et Kim 2017). Au niveau du foie, aucune différence n'est observée entre les deux groupes à l'issue de la surnutrition, contrairement à ce qui a pu être montré chez des sujets obèses (Timmers et al. 2011). Au niveau de la composition en acide gras, les mesures IRM montrent une baisse significative dans le tissu VAT du nombre de *nmidb* sans une diminution de *ndb* après la surnutrition et aucune différence entre les deux groupes. Ceci se traduit par une baisse de la proportion de polyinsaturés et une augmentation des mono-insaturés, ceci pourrait être en lien avec la modification de la composition en acides gras lors de la surnutrition (augmentation des MUFA, diminution des PUFA avec la surnutrition). Au niveau du tissu adipeux sous-cutané, la chromatographie en phase gazeuse semble montrer une baisse significative des valeurs de *nmidb* ( $n = 5$ ). Cependant, les effets sont difficilement détectables au bout d'un mois de surnutrition sachant que la demi-vie moyenne des acides gras du tissu adipeux est de 6 à 9 mois (Hodson, Skeaff, et Fielding 2008) et que la modification de la composition en AG du régime avec la surnutrition n'était pas franche.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à comparer scrupuleusement différentes méthodes dédiées à la quantification lipidique dans le cadre d'une étude clinique avec un protocole de surnutrition. La DEXA et l'IRM (CSE-MRI) ont permis d'observer une augmentation significative des volumes des tissus adipeux abdominaux (SAT et VAT). Grâce

aux données IRM, il a été possible de mesurer une différence significative du rapport volumique VAT/SAT entre le groupe ayant reçu des polyphénols et celui ayant reçu un placebo. Dans cette étude, le rapport VAT/SAT du groupe placebo augmente au cours de la surnutrition alors qu'il reste constant pour le groupe avec des polyphénols.

Au niveau du taux de graisse hépatique, le challenge résidait dans l'estimation de faibles quantités de PDFF. Ici, les mesures IRM sont fortement corrélées aux mesures SRM. Malgré des valeurs IRM plus élevées qu'en SRM, la différence des résultats avant et après la surnutrition est très similaire entre les deux méthodes. Enfin aucune différence significative n'a été observée entre le groupe placebo et le groupe polyphénol.

Au niveau de la composition lipidique, c'est la première fois – à notre connaissance – qu'une estimation réalisée par CSE-MRI est comparée à celle faite par la SRM et par la chromatographie en phase gazeuse (GC). Les valeurs par CSE-MRI et GC sont bien corrélées ainsi qu'entre les données SRM et GC. Cependant, si nous regardons les coefficients directeurs des droites de régression (pour la corrélation), ils ne sont pas égaux à 1. Ceci a pour conséquence que le biais de mesure dépend de la valeur mesurée.

A la vue de ces résultats, l'imagerie CSE-MRI est un outil qui permet de suivre l'évolution et l'adaptation des tissus adipeux à la surnutrition : pour l'étude du contenu lipidique du foie, pour le calcul du volume et de la composition lipidique des tissus adipeux abdominaux. Les données IRM et SRM, ici présentées dans la deuxième partie de ce chapitre et couplées à d'autres mesures biologiques (concentration ALAT, dimension et nombre d'adipocytes, TNF $\alpha$ , Leptin ...), seront utiles et pertinentes pour étudier l'impact de la consommation de polyphénols en période de surnutrition.





# Chapitre 4

## Développements expérimentaux

### Sommaire

---

4.1.	Quantification des omégas-3 par spectroscopie (PRESS).....	108
4.1.1.	Protocole expérimental pour la caractérisation du spectre lipidique à 4,7T.....	108
4.1.2.	Evolution du groupement méthyl selon le TE.....	110
4.1.3.	Mesure des T2 de chaque pic et de la composition lipidique.....	112
4.1.4.	Mesure de la proportion d'omégas 3.....	117
4.2.	J-édition (MEGA-PRESS).....	123
4.2.1.	Application de la MEGA-PRESS en ciblant les groupements liés à la poly- insaturation.....	124
4.2.2.	Application de la MEGA-PRESS en ciblant les groupements liés aux omégas-3 .. .....	125
4.2.3.	Implémentation du spectre OFF.....	126
4.2.4.	Conclusion.....	127
4.3.	Imagerie spectroscopique EPSI : Comparaison avec la séquence MGE et la séquence PRESS.....	128
4.3.1.	Lecture et correction du signal provenant de la séquence EPSI.....	128
4.3.2.	Comparaison de la séquence EPSI-FID avec la séquence MGE.....	130
4.3.3.	Comparaison des deux motifs d'EPSI : EPSI-FID et EPSI-SE.....	133
4.3.4.	Comparaison de la séquence EPSI-SE avec la séquence PRESS.....	135
	Conclusion.....	144

---

Ce dernier chapitre est dédié aux développements expérimentaux qui ont été réalisés sur l'IRM 4,7 T de la plateforme PILoT en parallèle de l'étude clinique. Il faut noter que ce chapitre présente des résultats préliminaires qui offrent des perspectives d'investigations à approfondir. Ici, l'élément moteur est la quantification de la composition lipidique : 1) par l'estimation des paramètres *ndb* et *nmidb* comme dans les chapitres précédents, 2) par le calcul de la proportion d'omégas-3, le tout dans un contexte préclinique. Avant d'expliquer le déroulé de ce chapitre, nous allons voir les défis de la quantification des omégas-3.

### *Pourquoi quantifier la proportion d'omégas-3 ?*

Nous avons vu que les techniques de quantification des graisses étaient en plein essor notamment grâce à des méthodes fondées sur des séquences de spectroscopie et des méthodes d'imagerie fondées sur des échos de gradient multiples. Cependant, pour le moment, ces méthodes se limitent à estimer des proportions d'acides gras polyinsaturés (PUFA), mono-insaturés (MUFA) et saturés (SFA). De plus, la proportion de PUFA estimée à partir de *nmidb* est la plupart du temps surestimée. En effet, en utilisant la relation (4.1.1), les chaînes lipidiques sont considérées comme di-insaturées (un seul groupement CH<sub>2</sub> interrompant des deux doubles liaisons).

$$PUFA = \frac{nmidb}{3} \times 100 \quad (4.1)$$

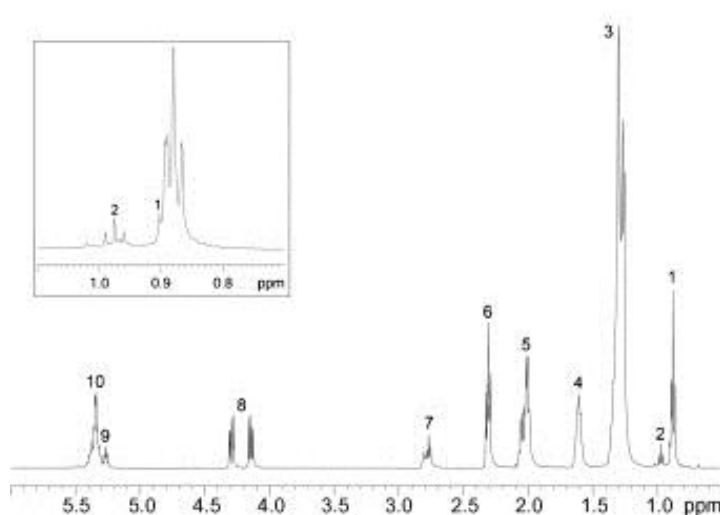
S'il est vrai que la majorité des chaînes lipidiques sont di-insaturées (Linoleic acide 18:2n-6, ~79-82% des PUFA (Petrus et al. 2017)), le tissu adipeux est aussi constitué de chaînes contenant plus de deux doubles liaisons ( $\gamma$ -Linoleic acide 18:3n-6,  $\alpha$ -Linolenic acide 18:3n-3, Di-homo- $\gamma$  linolenic acide 20:3n-6, Arachidonic acide 20:4n-6, Eicosapentaenoic acide 20:5n-3, Docosatetraenoic acide 22:4n-6, Docosapentaenoic acide 22:5n-6, Docosahexaenoic acide 22:6n-6). Aussi, la quantification des omégas-3 (X:Yn-3) permettrait d'ajuster le calcul des PUFA (18:3n-3 représente ~ 8-9% des PUFA, autres omégas-3 ~3-5%).

De plus, depuis ces dernières décennies, l'intérêt des effets possibles de la consommation des omégas-3 sur l'organisme est grandissant (Ruxton et al. 2004; Hooper et al. 2006; Musa-Veloso et al. 2018). Des études suggèrent que l'ingestion d'omégas-3 permettrait de réduire la proportion de graisse dans le foie chez des personnes ayant des stéatoses hépatiques non-alcooliques (Marsman et al. 2011; Argo et al. 2015). Notamment, une étude montre que le ratio omégas-6/omégas-3 baisse avec la prise de complément en omégas-3 pour atteindre des taux proches de ceux des sujets contrôles (Marsman et al. 2011). Cependant, la quantification des omégas-3 dans ces tissus est souvent réalisée par

chromatographie en phase gazeuse et qui nécessite une biopsie. L'utilisation de cette technique invasive est limitante et ne peut être réalisée sur des sujets sains. Une méthode non-invasive est indispensable pour quantifier la concentration d'oméga-3 *in vivo* chez l'homme. A notre connaissance, peu d'études ont relevé le défi en spectroscopie (PRESS (Lundbom et al. 2009), MEGA-PRESS (Škoch, Tošner, et Hájek 2014), PRESS vs STEAM (Fallone, McKay, et Yahya 2018) et aucune en imagerie.

### Comment quantifier la proportion d'oméga-3 par SRM ?

Les oméga-3 ont une double liaison sur le 3<sup>ème</sup> carbone de la chaîne lipidique en partant du groupement de méthyl  $\text{CH}_3$ . Ainsi le groupement méthyl des oméga-3 ( $\text{CH}_3\omega 3$ ) a un déplacement chimique différent de celui des autres acides gras en raison de son environnement électronique différent. Ce dernier va résonner proche de 1 ppm au lieu de 0,9 ppm ( $\text{CH}_3$ ), la différence fréquentielle est par conséquent subtile (figure 4.1). Dans un contexte *in vivo* où les pics sont élargis par les inhomogénéités de  $B_0$  plus élevées, ces pics peuvent se superposer. De plus, la concentration d'oméga-3 est faible (de l'ordre de 0,8 à 2%). Le pic du groupement  $\text{CH}_3\omega 3$  est donc difficile à identifier et de surcroît à quantifier. Le groupement de  $\text{CH}_2$  positionné entre le  $\text{CH}_3\omega 3$  et la double liaison aura lui aussi une fréquence de résonance différente (2,1 ppm au lieu de 1,3 ppm pour le groupement de  $\text{CH}_{2n}$ ). Ce dernier sera totalement confondu avec les pics de  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$  (à 2,24 ppm) et de  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  (à 2,02 ppm).



**Figure 4.12 : Spectre d'huile de colza réalisé par spectroscopie proton à 11,7 T, extrait de la publication (Yeung et al. 2008). Avec un zoom sur la région 0,7-1,1 ppm. Les pics désignent :**

- 1, méthyle ( $-\text{CH}_3$ ) ;
- 2, méthyle des oméga-3 ;
- 3, méthylène ( $-\text{CH}_2-$ ) ;
- 4,  $\beta$ -carboxyle ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) ;
- 5,  $\alpha$ -oléfinique ( $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ) ;
- 6,  $\alpha$ -carboxyle ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) ;
- 7, diallylique ( $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$ ) ;
- 8, glycérol ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ ) ;
- 9, glycérol ( $-\text{CH}-\text{O}-\text{CO}-$ ) ;
- 10, oléfinique ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ).

### Déroulé des développements expérimentaux

Ainsi, dans la première partie de ce chapitre (4.1), nous avons quantifié les oméga-3 *in vitro* avec une séquence PRESS en nous basant sur les hypothèses avancées par Lundbom :

utilisation de TE long pour atténuer la contribution au signal du pic de méthylène qui peut déborder sur le pic lié aux omégas-3 (Lundbom et al. 2009). Le principal inconvénient de cette méthode est une dégradation du rapport signal sur bruit (SNR : signal-to-noise ratio) liée à l'utilisation de TE longs. Puis, dans la deuxième partie de ce chapitre (4.2), nous avons implémenté une séquence de J-édition MEGA-PRESS pour rehausser le pic lié aux omégas-3 à TE court en nous basant sur des travaux antérieurs (Mescher et al. 1998; Škoch, Tošner, et Hájek 2014). Enfin, motivé par l'envi de transférer ce qui se fait en spectroscopie vers l'imagerie, la dernière partie de ce chapitre (4.3) est dédiée à des comparaisons de séquences d'imagerie spectroscopique. Nous avons confronté la séquence EPSI (echo planar spectroscopic imaging) avec différents motifs (écho de gradient et écho de spin) à la séquence multi-écho de gradient et à la séquence PRESS. Enfin, nous avons fini par définir une stratégie d'acquisition en EPSI pour faire une cartographie des omégas-3.

## **4.1. Quantification des omégas-3 par spectroscopie (PRESS)**

Dans la littérature, nous pouvons trouver plusieurs protocoles pour analyser le spectre lipidique fondés sur des séquences de spectroscopie PRESS ou STEAM (Fallone, McKay, et Yahya 2018; Hamilton et al. 2009) et utilisant des TE courts pour avoir plus de signal (Hamilton, Yokoo, et al. 2011) ou des TE longs (~200ms) pour avoir une meilleure distinction des pics étudiés (Lundbom et al. 2009; Fallone, McKay, et Yahya 2018; Yahya et Fallone 2010). Ici nous choisissons de caractériser le spectre lipidique de différentes huiles avec des TE multiples afin d'évaluer l'impact du choix des TE sur l'estimation des temps de relaxation T2 de chaque pics et d'adopter la meilleure stratégie de quantification, i.e celle qui nous permettrait d'avoir accès à la proportion d'acide gras de type omega-3.

### **4.1.1. Protocole expérimental pour la caractérisation du spectre lipidique à 4,7T**

Le protocole expérimental sur l'IRM préclinique est composé d'une séquence PRESS. La séquence STEAM disponible sur le système 4,7T présentait des artefacts, possiblement dus au mauvais équilibrage des gradients de brouillage de la séquence que nous ne pouvions pas modifier. Ces artefacts ne pouvaient pas non plus être corrigés en traitement post-acquisition. La séquence STEAM n'a donc pas été utilisée. Les paramètres d'acquisition appliqués sur les huiles sont les suivants :

- 17 TE = [15 20 30 40 50 80 110 140 170 200 230 290 350 410 470 530 590] ms
- Fréquence d'échantillonnage = 4 kHz
- Nombre de points = 4096
- TR = 3000 ms
- Bande passante impulsions RF = 5400 Hz pour l'impulsion 90° et 6840 Hz pour l'impulsion 180°
- OVS : on
- 32 accumulations
- Volume de mesure (voxel) = 5x5x5 mm<sup>3</sup>.
- Temps d'acquisition total = 30 min/huile

Le protocole expérimental a été appliqué séquentiellement sur 10 huiles (Sésame, Avocat, Colza, Noisette, Olive, Pépin de raisin, Tournesol, Noix, Lin, Pistache). Chaque huile a été conditionnée dans un tube de 15 mL de la marque Greiner (15 mm de diamètre et 930 mm de long). Une bobine en quadrature (Rapid Biomedical GmbH) de 32 mm de diamètre interne a été utilisée en émission et en réception. Les acquisitions ont été réalisées à température ambiante soit 25°C. La composition en acide gras de ces huiles a été déterminée par une analyse de chromatographie en phase gazeuse (tableau 4.1) réalisée sur la plate-forme de lipidomique de l'INSA Lyon sur le campus de la Doua.

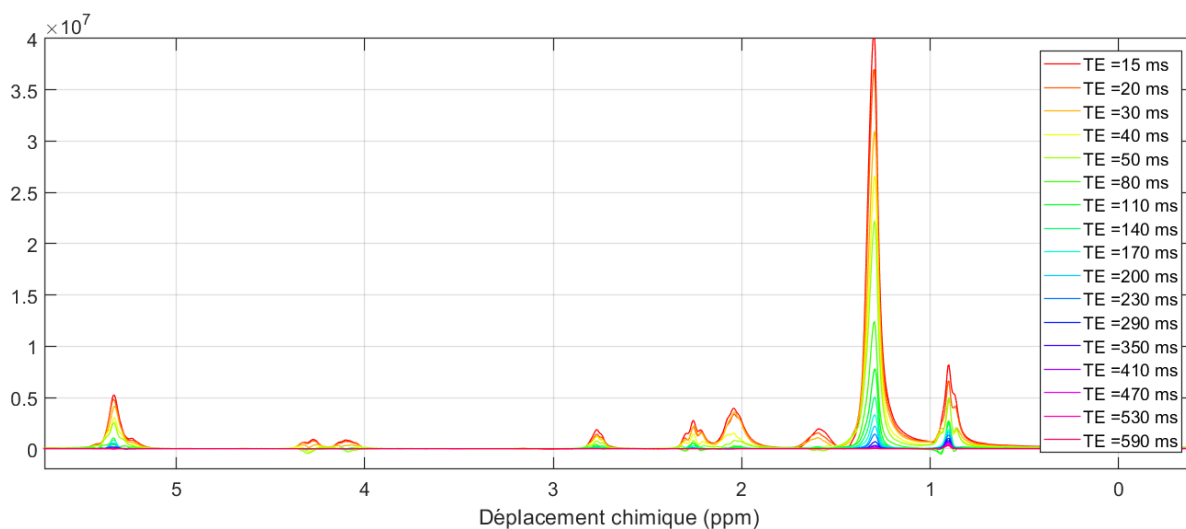
**Tableau 4.6 : Proportions en acides gras saturés (SFA), mono-insaturés (MUFA) et polyinsaturés (PUFA), d'oméga-3 ( $\omega$ -3) et d'oméga-6 ( $\omega$ -6), le nombre moyen de double liaison par triglycéride (ndb) et le nombre moyen de méthylènes interrompant des doubles liaisons par triglycéride (nmidb) pour différentes huiles végétales mesurées par chromatographie en phase gazeuse.**

	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	$\omega$ -3 (%)	$\omega$ -6 (%)	ndb	nmidb
Noisette	9,2	73,7	6,4	0,22	6,94	2,92	0,23
Pépin de raisin	15,8	39	44,7	0,3	44,62	3,89	1,37
Tournesol	14,9	48,4	36,7	0,3	36,4	3,67	1,11
Avocat	21	72,7	6,2	0,4	5,81	2,58	0,21
Sésame	20,4	54,4	25,1	0,4	24,72	3,17	0,78
Olive	19,2	76,1	4,9	0,5	4,39	2,60	0,17
Pistache	15,8	65,2	19	0,5	18,5	3,11	0,59
Colza	9,3	74,2	16,4	4,6	11,81	3,35	0,63
Noix	12,6	37,8	49,7	7,69	41,96	4,35	1,73
Lin	13,8	33,3	53	34,37	18,58	5,22	2,63

Notons que la proportion d'oméga-3 est très faible pour 7 huiles (<1%) et même inférieure aux proportions théoriques des tissus adipeux d'humain (1% (Hodson, Skeaff, et Fielding 2008)) ou de souris (2,3% (Li, Fu, et Li 2010)). La proportion d'oméga-3 est fortement élevée pour l'huile de lin (34,37% de type C18:3 n-3) et modérément pour les huiles de noix et de colza (respectivement 7,69% et 4,6%). Pour toutes les huiles la proportion d'oméga-3 est constituée principalement du type C18 :3 n-3 et faiblement du type C22 :3 n-3 (< 0.2%).

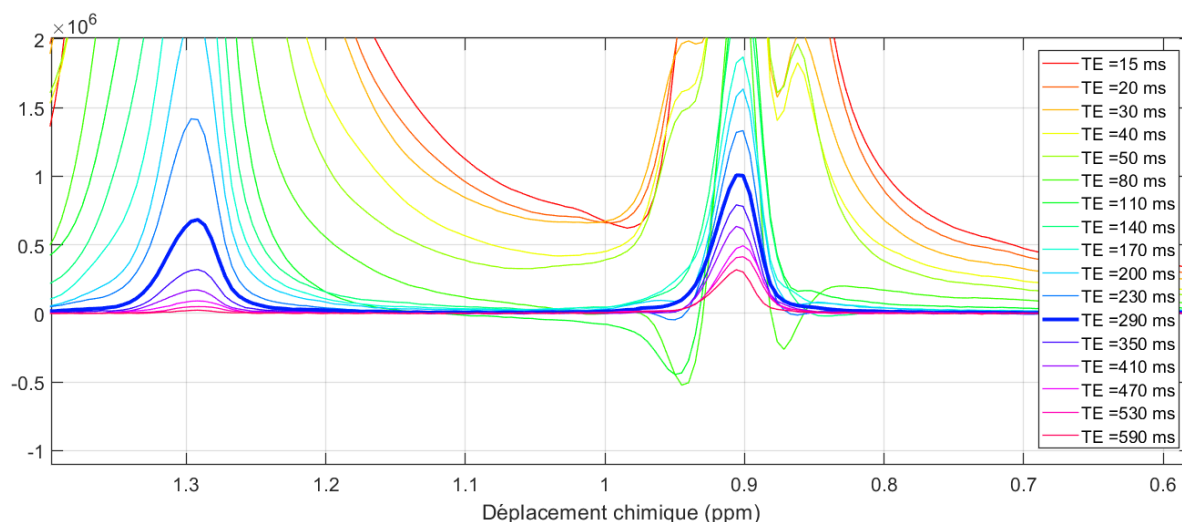
#### 4.1.2. Evolution du groupement méthyl selon le TE

Tous les spectres acquis ont été recalés en fréquence automatiquement en fonction du pic résonant à 0,90 ppm (figure 4.2). En effet, le pic résonant à 1,30 ppm disparaît plus rapidement que le pic à 0,90 ppm à mesure que le temps d'écho s'allonge car il présente une composante T2 plus courte.



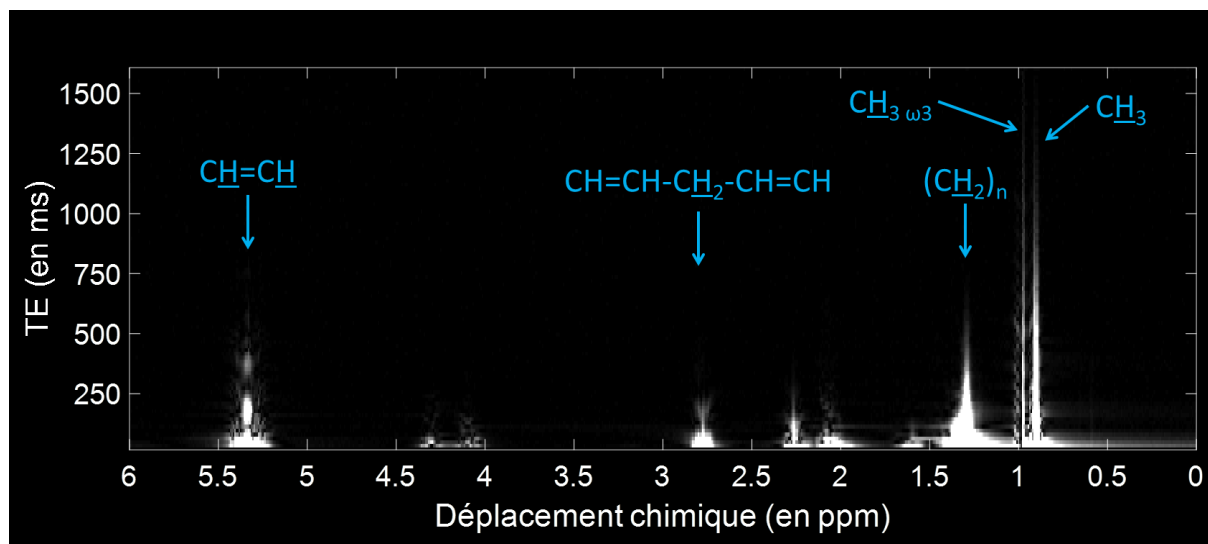
**Figure 4.2 : Atténuation des différents pics du spectre d'un échantillon d'huile de sésame selon le TE pour un TR de 3 s et 32 accumulations par TE.**

A partir de l'écho à 230 ms, l'amplitude du pic à 0,90 ppm est plus importante que celle du pic à 1,3 ppm (figure 4.3). La détection du pic se fait automatiquement en détectant le maximum du spectre sur un intervalle fixé manuellement pour le premier spectre et défini automatiquement pour les TE suivants à partir de la première détection.



**Figure 4.3 : Spectre d'huile de sésame illustrant l'atténuation progressive du pic à 1,30 ppm et à 0,90 ppm avec l'augmentation du TE**

Afin d'illustrer l'évolution des spectres selon le TE, un autre protocole d'acquisition a été réalisé, typique d'une acquisition J-résolue, avec un pas d'échantillonnage fin ( $TE = n * 16$  ms,  $n = 1 \dots 100$ ) sur l'huile de noix uniquement (figure 4). D'après la figure 4.4, les groupements méthyl apparaissent avoir un T2 plus long que les autres groupements. Comme toutes les résonances des triglycérides sont couplées, le temps de relaxation mesuré ici doit être considéré comme un T2 apparent pour chaque groupement.



**Figure 4.4 : Intensité du signal de SRM (PRESS, TR = 4 s, 32 accumulations) dans le domaine fréquentiel pour différents temps d'écho (TE) et selon le déplacement chimique. Les intensités des deux groupements de CH<sub>3</sub> montrent qu'ils sont encore présents à des TE très longs (> 1s). Il est donc attendu que ces groupements aient des T2 bien plus longs que les autres résonances.**

### 4.1.3. Mesure des T2 de chaque pic et de la composition lipidique

#### Mesure des T2 de chaque pic

La mesure des T2<sub>k</sub> des k pics des composantes de la graisse se fait ici dans le domaine fréquentiel. Le maximum de l'amplitude de chaque pic est détecté automatiquement. A partir du maximum, un intervalle en ppm est défini pour chaque pic et l'aire sous la courbe (A<sub>k</sub>) est calculée pour chaque écho en conservant le même intervalle. L'effet de la diffusion contribuant à une perte de signal et un raccourcissement du T2 apparent est possible. En dehors, des groupements méthyles, les autres pics possèdent un T2 relativement court (entre 15 et 50 ms). L'expression de décroissance du signal de façon mono-exponentielle (équation 4.2) peut se linéariser avec la fonction logarithmique népérienne (équation 4.3).

$$A_k(TE) = A_{0k} \times \exp\left(-\frac{TE}{T2_k}\right) \quad (4.2)$$

Avec A<sub>0k</sub> l'aire sous la courbe à TE = 0 ms, A<sub>k</sub> l'aire sous la courbe mesurée à TE, T2<sub>k</sub> le T2 apparent de la k<sup>ième</sup> composante.

$$\ln(A_k(TE)) = \ln(A_{0k}) - \frac{TE}{T2_k} \quad (4.3)$$

Ici, il a donc été choisi de faire une approximation linéaire de l'aire sous la courbe en fonction des TE (équation 4.3) pour chaque pic en pondérant fortement les premiers échos qui ont plus de signal.

Les étapes de la méthode d'estimation des T2<sub>k</sub> et A<sub>0k</sub> sont les suivantes :

1. Indication du déplacement chimique des 9 pics de référence considérés [0,90 1,30 1,60 2,04 2,25 2,77 4,07 4,20 5,30] en ppm ;
2. Recherche du maximum de l'amplitude pour chaque pic ;
3. Intervalle de fréquence d'analyse pour chaque pic [0,15 0,16 0,09 0,08 0,08 0,15 0,09 0,09 0,20] ;
4. Calcul de l'aire sous la courbe pour chaque pic sur l'intervalle correspondant, pour chaque écho ;
5. Approximation linéaire pondérée sur les premiers échos : première estimation de A<sub>0k</sub> et T2<sub>k</sub> (pondérations des 8 échos [100 90 60 30 20 1 1 1]).



L'estimation des temps de relaxation T2 se fait dans un premier temps avec les TE courts (de 15 ms à 140 ms). Le SNR est calculé comme le rapport entre l'amplitude du premier point de la FID divisée par l'écart-type du bruit mesuré sur les derniers points de la FID. L'appréciation du SNR ici est tout à fait relative, sachant qu'un pic prépondérant augmentera le SNR même s'il n'est pas d'un intérêt direct, puisque le premier point temporel correspond à la somme de toutes les aires des pics. Ici, nous considérons qu'en dessous d'un SNR de 120 (valeur empirique déterminée à partir de nos simulations chapitre 2 figure 2.3) pour des TE courts, nous aurons des difficultés à estimer les résonances en faibles quantités comme le pic à 2,8 ppm. Il faut noter ici que le SNR est bien supérieur à celui obtenu *in vivo* chez l'homme à 3T (>2000 vs 200) pour les échos utilisés. Ceci permet alors de s'affranchir de l'impact du SNR sur le calcul de l'aire sous la courbe. Dans le tableau 4.7, les valeurs de la moyenne des T2<sub>k</sub> ( $\overline{T2_k} = \sum_{i=1}^n \frac{T2_{k,i}}{n}$ , n le nombre d'huile et T2<sub>k,i</sub> le T2<sub>k</sub> pour chaque huile) et

l'écart-type ( $s_{T2_k} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (T2_{k,i} - \overline{T2_k})^2}{n-1}}$ ) sont répertorié pour les k résonances.

**Tableau 4.7 : Estimations du T2 apparent de chaque composante de signal lipidique à partir de l'aire sous la courbe de plusieurs TE (15 20 30 40 50 80 110 140 ms). Ici le T2 apparent obtenu pour la résonance à 0,90 ppm semble sous-estimé par rapport à ce qui a été conjecturé figure 4.4.**

Déplacement chimique (ppm)		0,90	1,3	1,6	2,02	2,23	2,8	4,2	4,3	5,3
<b>T2</b>	Moyenne	<b>47,79</b>	51,83	19,39	27,14	33,06	50,58	20,92	27,18	43,58
<b>(ms)</b>	écart-type	<b>4,19</b>	2,29	0,89	0,95	2,55	3,57	1,71	2,36	1,00

En utilisant uniquement des temps d'écho courts (< 150ms), l'estimation du T2 apparent du méthyl (pic à 0,90 ppm) est sous-estimé par rapport à ce qui a été conjecturé sur la figure 4.4. Nous déterminons un T2 pour les groupements méthyl plus petit que celui du méthylène alors que sur la figure 4.4, le pic de méthyl est toujours présent à un TE d'une seconde contrairement au pic de méthylène. Les valeurs de T2 présentées dans le tableau 4.2 sont très proches des valeurs répertoriées dans la thèse d'Amandine Coum (tableau 4.3) calculées sur des huiles à 4,7T comme dans notre cas. Le tableau 4.3 montre la variété des estimations faites pour le T2 apparent de la résonance à 0,90 ppm. Dans de nombreux cas, le groupement de méthyl a une valeur de T2 estimé plus grande que celle du groupement méthylène, mis à part pour les deux études de Hamilton et al. de 2011 qui utilisent des TE allant de ~10 à 30 ms et pour des études utilisant des TE plus longs (jusqu'à 350 ms).

**Tableau 4.3 : Récapitulatif des valeurs de la littérature du T2 apparent (en ms) pour les différentes résonances. L'estimation du T2 du groupement méthyl (à 0,90 ppm) varie fortement selon les TE utilisés.**

	Objet	B0	TE (ms)	Séquence	Déplacement chimique (en ppm)								
					0,9	1,3	1,6	2,03	2,21	2,8	4,09	4,3	5,3
(Strobel, Hoff, et Pietzsch 2008)	Souris	7 T	de 12 à 50	PRESS	41,66 ± 1,97	51,43 ± 0,67	18,95 ± 4,00	25,74 ± 1,10	33,49 ± 1,92	46,96 ± 1,45	19,47 ± 3,75	20,47 ± 5,35	36,44 ± 1,80
(Coum 2015)	Huiles	4,7 T	de 11 à 150	PRESS	44 ± 14	51 ± 2	19 ± 22	31 ± 17	30 ± 10	45 ± 7	/	/	41 ± 8
(Hamilton, Smith, et al. 2011)	Souris (post-mortem)	3 T	de 13 à 33	STEAM	80,1 (50,7–110,2)	54,7 (42,8–61,4)	/	51,9 (51,8–52,1)	/	46,2 (44,5–47,9)	/	/	44,1 (42,6–45,6)
(Hamilton et al. 2009)	Lard rendu liquide	1,5 T	de 20 à 60	STEAM	50,3	90,2	/	45,8	/	50,6	/	/	50,4
		1,5 T	de 20 à 60	PRESS	19,6	71,4	/	31,1	/	15,7	/	/	26,2
		3 T	de 20 à 60	STEAM	44,6	84,9	/	54,6	/	62,2	/	/	52,1
		3 T	de 20 à 60	PRESS	28,1	66,4	/	16,2	/	32,6	/	/	44,6
(Hamilton, Yokoo, et al. 2011)	Foie	3T	de 10 à 30	STEAM	71,4	46	/	41,9	/	41,5	/	25,4	38,7
(Ren et al. 2008)	Sujet sain (SAT)	7 T	de 20 à 180	STEAM	74 ± 6	69 ± 4	33 ± 6	42 ± 2	60 ± 3	59 ± 3	/	/	/
	Sujet sain (moelle osseuse)	7 T	de 20 à 180	STEAM	67 ± 8	63 ± 5	30 ± 6	39 ± 3	55 ± 4	58 ± 3	/	/	/
(Schick et al. 1993)	Humain	1,5 T	de 50 à 350	PRESS	200	/	90	30	80	60	/	/	70
(Lundbom et al. 2009)	Huiles	1,5 T	de 50 à 300	PRESS	264 ± 32	76 ± 4	/	/	/	/	/	/	/

### Estimation de la composition lipidique

Les paramètres  $ndb$  et  $nmidb$  peuvent être déterminés à partir des amplitudes de chaque composante  $A0_k$  calculées précédemment à partir des relations suivantes :

$$\begin{bmatrix} \frac{A0_{pic5.3+pic5.2}}{A0_{pic0.9}} \\ \frac{A0_{pic2.8}}{A0_{pic0.9}} \\ \frac{A0_{pic2.01}}{A0_{pic0.9}} \\ \frac{A0_{pic1.3}}{A0_{pic0.9}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 4 & -4 \\ -24 & 6 & -8 & 2 \end{bmatrix} / 9 \times \begin{bmatrix} Cste \\ CL \\ ndb \\ nmidb \end{bmatrix} \quad (4.4)$$

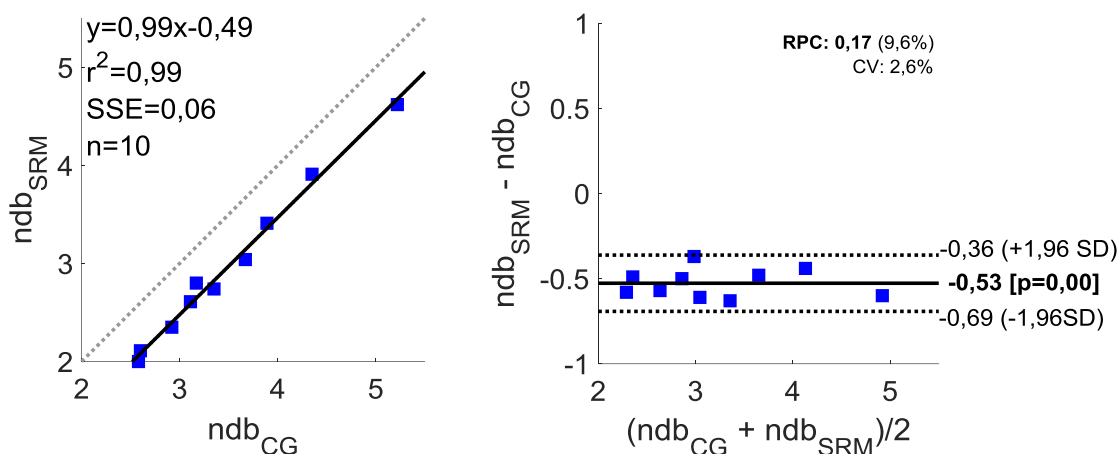
D'où le vecteur paramètre :

$$\begin{bmatrix} Cste \\ CL \\ ndb \\ nmidb \end{bmatrix} = pinv \left( \begin{bmatrix} 1 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 4 & -4 \\ -24 & 6 & -8 & 2 \end{bmatrix} / 9 \right) \times \begin{bmatrix} \frac{A0_{pic5.3+pic5.2}}{A0_{pic0.9}} \\ \frac{A0_{pic2.8}}{A0_{pic0.9}} \\ \frac{A0_{pic2.01}}{A0_{pic0.9}} \\ \frac{A0_{pic1.3}}{A0_{pic0.9}} \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

Où  $pinv$  représente la pseudo matrice inverse de Moore-Penrose.

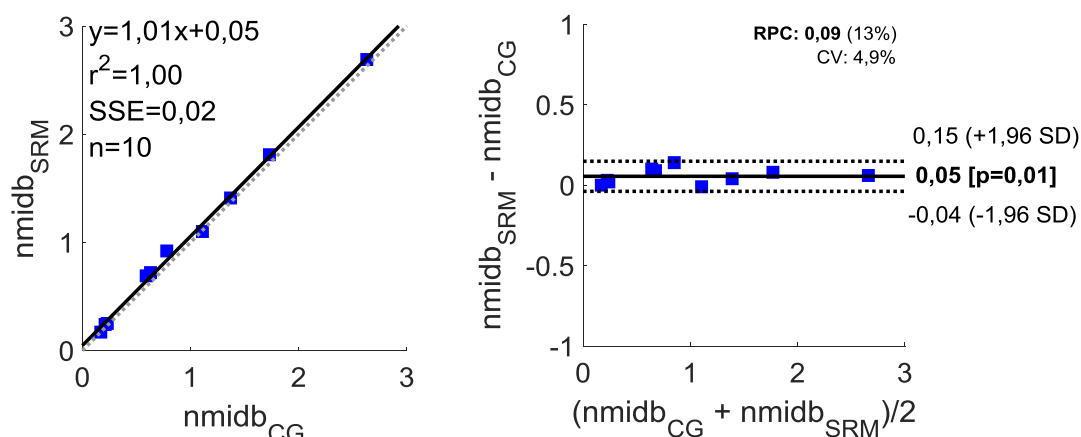
Dans la suite nous comparons les estimations de  $ndb$  et  $nmidb$  déterminées par cette relation aux valeurs mesurées par chromatographie en phase gazeuse (CG). De très bonnes corrélations sont trouvées entre les mesures réalisées sur le spectre lipidique et les analyses en CG ( $r = 1$  pour  $nmidb$  et  $r = 0.99$  pour  $ndb$ , figures 4.5 et 4.6). Cependant, nous observons un biais systématique pour les  $ndb$  correspondant à une sous-estimation de 0,53 point par rapport aux mesures en CG.

## ndb



**Figure 4.5 : Courbe de corrélation (à gauche) et Bland-Altman (à droite) de ndb (nombre moyen de double liaison par triglycéride) mesuré par SRM ou CG (chromatographie en phase gazeuse). Ces graphes nous montrent une très bonne corrélation entre les deux mesures avec une sous-estimation de ndb par SRM de 0,53.**

## nmidb



**Figure 4.6 : Courbe de corrélation (à gauche) et Bland-Altman (à droite) de nmidb (nombre moyen de méthylène interrompant des doubles liaisons par triglycéride) mesuré par SRM ou CG (chromatographie en phase gazeuse). Ces graphes nous montrent une très bonne corrélation entre les deux mesures avec une légère surestimation de nmidb par SRM de 0,05.**

Le biais observé sur les mesures de ndb pourrait venir d'un artéfact de déplacement chimique bien qu'il soit minimisé avec les bandes passantes choisies. Nous pouvons aussi observer que la valeur du biais est proche de 0,5, ce qui correspond à la valeur soustraite au rapport  $9/2 * A_{pic5,3} / A_{pic0,9}$  et liée à la contribution de la résonance à 5,2 ppm du glycérol. Nous ne pouvons distinguer ces deux résonances et en utilisant les relations ci-dessus, nous faisons

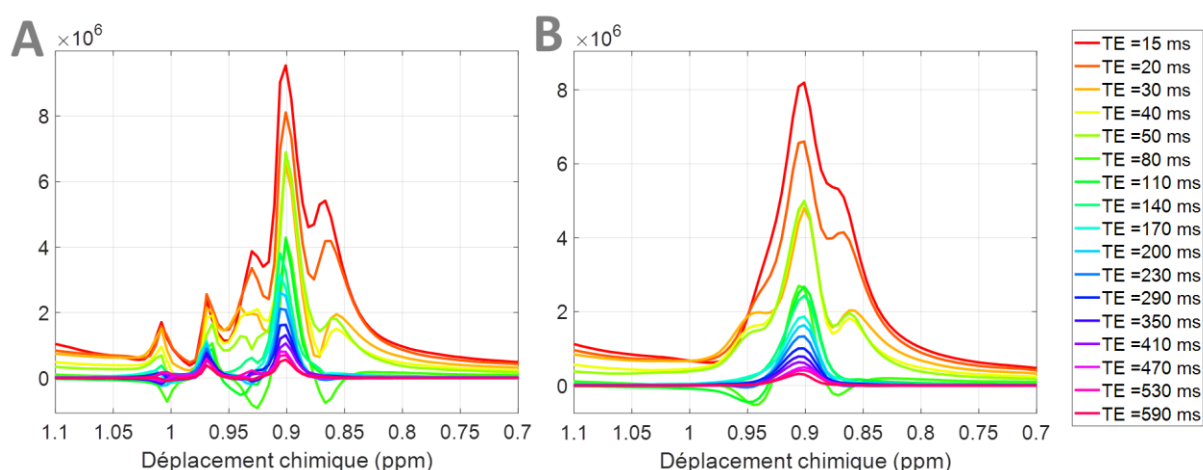
l'hypothèse que ces deux résonances évoluent pareillement avec le TE. Pour nous départir de cette approximation, il faudrait pouvoir prendre en compte les effets distincts des couplages scalaires (5,3 couplé au 2,8 et 5,2 couplé aux 4,3 et 4,2) et de la relaxation T2.

### Conclusion

La méthode PRESS associée à des TE multiples est un moyen effectif de quantifier les proportions d'acides gras des différentes huiles. Elle est cependant chronophage car elle demande d'utiliser plusieurs temps d'écho pour remonter à  $A0_k$  et  $T2_k$ ; de plus, en condition *in vivo*, l'homogénéité du champ magnétique est moins bonne et le rapport signal sur bruit inférieur ce qui rend son application clinique très compliquée. Il serait donc intéressant d'avoir une méthode de traitement du signal spectroscopique adaptée, similaire à celle décrite dans le chapitre 2 et qui permettrait de quantifier cette information à partir de l'analyse d'un unique temps d'écho mais en ayant des a priori sur les  $T2_k$ . Cependant la SRM, reste ici intéressante car elle nous permet de détecter les omégas-3 à des TE longs.

#### 4.1.4. Mesure de la proportion d'omégas 3

Pour le cas des omégas-3, le pic de  $CH_3\omega_3$  résonne ici à 0,97 ppm (figure 4.7). Sur les premiers échos nous pouvons voir que le  $CH_3$  résonant à 0,90 ppm forme un multiplet qui se superpose au pic à 0,97 ppm, alors que ce dernier disparaît à des TE plus longs (figure 4.7). Il apparaît donc pertinent d'utiliser des TE plus long (à partir de 140 ms) pour quantifier les omégas-3 et mesurer la valeur du temps de relaxation T2 du pic correspondant comme proposé par Lundbom et al. (2009).

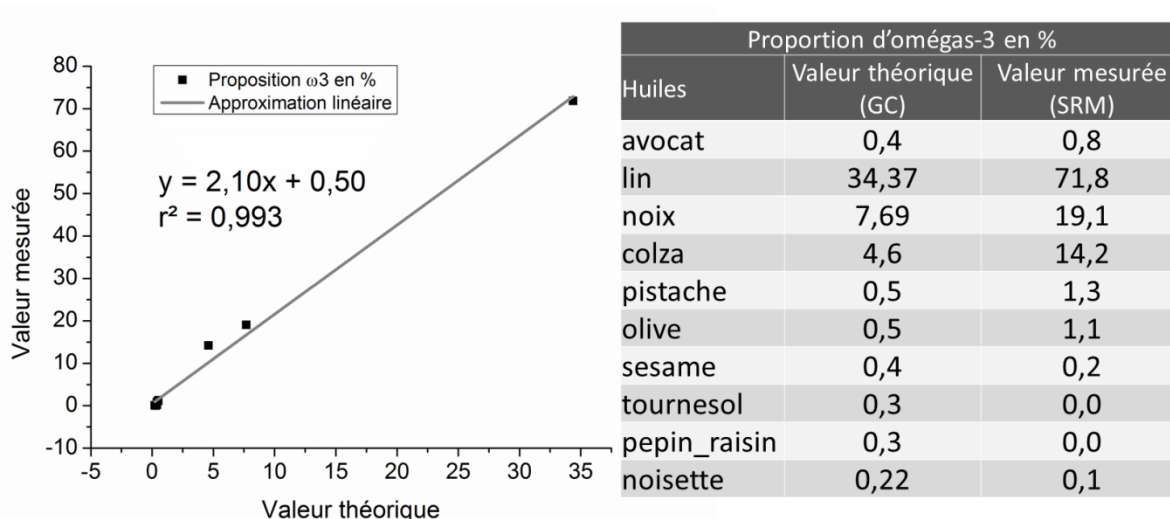


**Figure 4.7 : Spectres à différents TE, A) huile de noix avec 7,69 % d'omégas-3 et B) huile de sésame avec 0,4 % d'omégas-3. Le groupement de méthyl lié aux omégas-3 est bien visible ici sous la forme d'un multiplet aux résonances 1,00 - 0,97 - 0,94 ppm pour l'huile de noix.**

Pour quantifier la proportion d'omégas-3 on utilise la relation suivante :

$$PUFA\omega3 = A_{0,97ppm} / (A_{0,97ppm} + A_{0,90ppm})$$

Cependant le calcul de  $A_{0,97ppm}$  est fortement influencé par le groupement voisin. Il faut se placer à des TE où le pic à 0,90 ppm ne se superpose pas au pic à 0,97 ppm. Ainsi nous avons choisi des TE compris entre 350 ms et 590 ms. Il faut noter que sur l'ensemble des huiles étudiées, le pic de  $CH_3\omega_3$  est distinctement visible pour 6 huiles (avocat, lin, noix, colza, pistache et olive). Pour les autres, il est confondu avec le pic voisin. En utilisant 5 TE allant de 350 ms à 590 ms, nous observons une très bonne corrélation entre les proportions  $\omega_3$  mesurées par SRM et par chromatographie en phase gazeuse (coefficient de corrélation de Pearson = 0,997,  $p < 0,001$  et coefficient de corrélation de Spearman = 0,954,  $p < 0,001$ , figure 4.8).



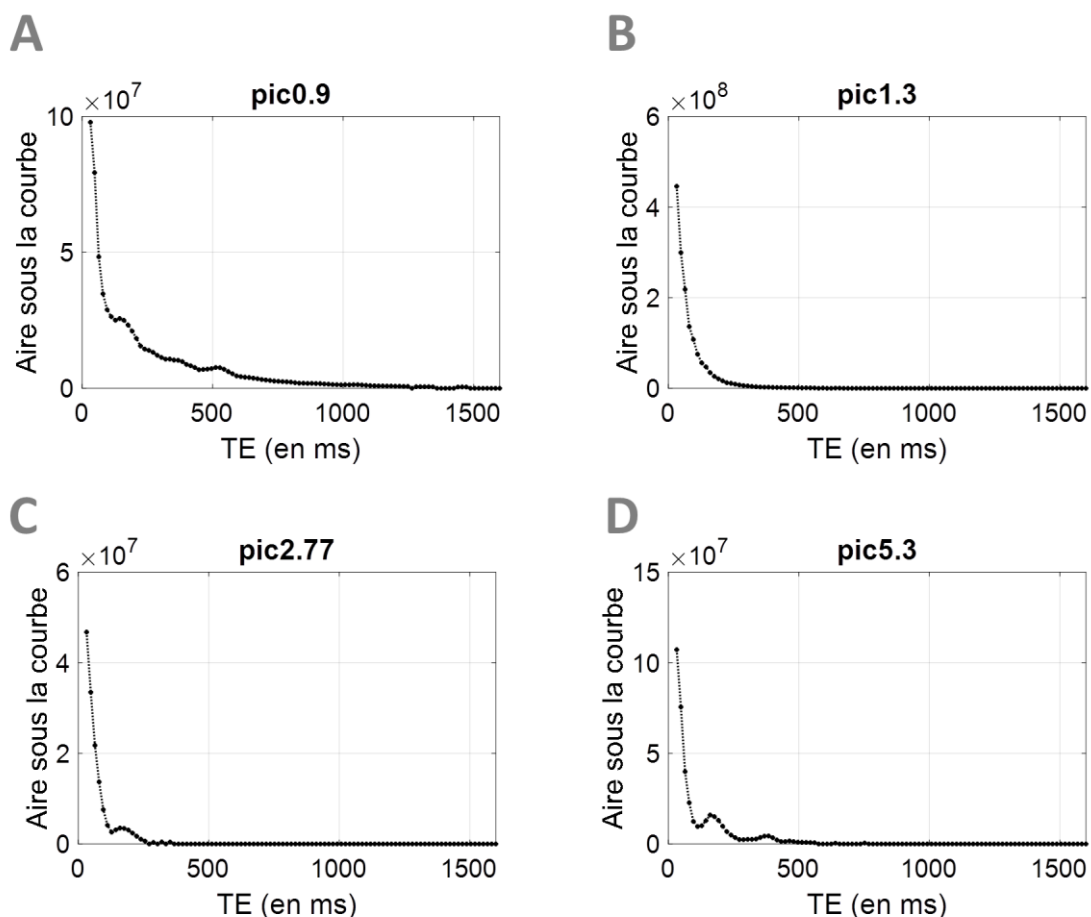
**Figure 4.8 : Estimation des proportions d'omégas-3 ( $\omega_3$ ) à partir d'une séquence PRESS avec correction en T2 (PRESS : 5 TE = 350 410 470 530 590 ms, TR = 3 s, 32 accumulations).**

En prenant en compte toutes les huiles, le SNR moyen était de  $220 \pm 40$ ,  $174 \pm 47$ ,  $123 \pm 38$ ,  $127 \pm 80$ ,  $79 \pm 41$  pour des TE de 350, 410, 470, 530, 590 ms respectivement. Le SNR étant plus faible, le bruit peut avoir un impact sur le calcul des aires sous les pics. Le T2 moyen est estimé à  $550 \pm 470$  ms [200 à 1680 ms] pour le pic à 0,97 et à  $270 \pm 38$  ms pour le pic à 0,90 ppm. L'estimation du temps T2 des omegas-3 a un écart-type élevé vis-à-vis de la moyenne (CV de 85%). Il faut noter ici que la valeur du T2 apparent augmente en fonction de la concentration d'omégas-3 (coefficient de corrélation de Pearson = 0,943 et de Spearman = 0,691). En prenant uniquement les huiles avec une faible concentration d'omégas-3, le T2 apparent est de 300 ms, ce qui est proche de celui du groupement à 0,90 ppm. Les huiles de

lin, noix et colza ont respectivement un T2 apparent des omégas-3 estimé à 1680 ms, 970 ms et 790 ms.

Lundbom et al. (2009) ont estimé la proportion d'omégas-3 à partir d'un seul TE de 140 ms et donc sans faire de correction du T2 apparent. Ils reportent des valeurs SRM sous-estimées d'un facteur 10 par rapport à la chromatographie en phase gazeuse. Pour comparer, nous avons calculé la proportion d'omégas-3 à partir d'un TE de 140 ms. Nos résultats montrent que les valeurs SRM sont surestimées de 1,4 fois les valeurs CG avec des valeurs très incohérentes pour les huiles de sésame, tournesol, pépin de raisin et noisette. Ces valeurs aberrantes peuvent s'expliquer par le fait que la résolution spectrale n'était pas suffisante entre les deux groupements de méthyl, résultant en un chevauchement des pics de résonance.

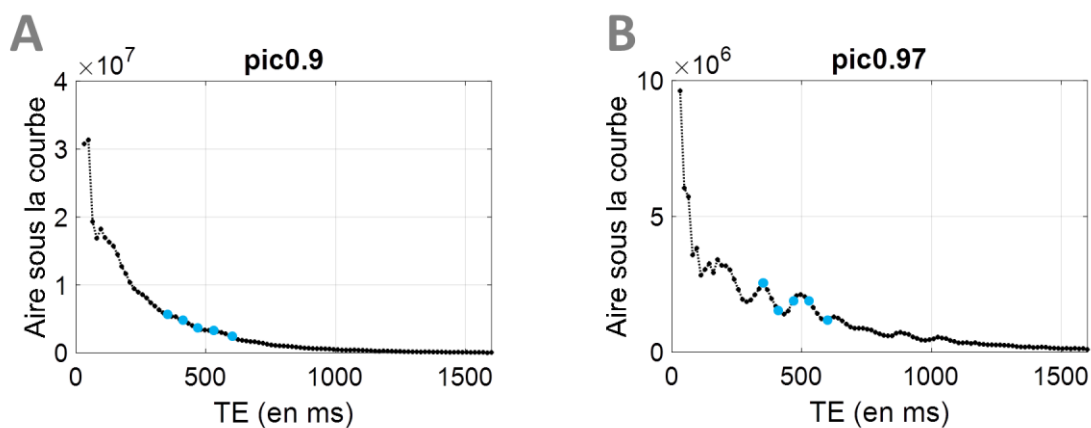
Bien que nous observions une très bonne corrélation, les proportions estimées sont supérieures aux valeurs théoriques. Ceci indiquerait que la concentration de CH<sub>3</sub> résonnant à 0,90 ppm est sous-estimée ou bien que la concentration de CH<sub>3</sub>ω<sub>3</sub> est surestimée, en considérant les résultats de la chromatographie en phase gazeuse comme étant la référence. Par ailleurs, le groupement de méthyl CH<sub>3</sub>ω<sub>3</sub> est complexe à modéliser. Dans la littérature, il a été reporté que la J-modulation impacte l'estimation de A<sub>0</sub> et T<sub>2</sub> du groupement de méthyl (Yahya et Fallone 2010). Le choix des valeurs de TE fondé sur les travaux de Lundbom et al. (2009) est peut-être à redéfinir et étudier plus profondément. Il faudrait pouvoir caractériser les couplages scalaires J. Dans ce but, nous avons exploité l'expérience utilisant un échantillonnage plus fin en TE (TE = n\*16, n = 1...100). La figure 4.9 montre les effets de la J-modulation sur nos intégrations pour les pics d'oléfinique (5,3 ppm), de diallylique (2,8 ppm), de méthylène (1,3 ppm) et de méthyl (1-0.88 ppm). Pour les groupements « oléfinique », « diallylique » et « méthyl », les courbes ne suivent pas parfaitement une évolution suivant une exponentielle décroissante comme modélisé précédemment.



**Figure 4.9 : Evolution de l'aire sous la courbe (ASC) des différents pics de résonance (A, méthyl de 0,75 à 1,05 ppm ; B, méthylène de 1,15 à 1,46 ppm ; C, diallylic de 2,62 à 2,92 ppm ; D, oléfinique de 5,1 à 5,5 ppm). Les ASC des pics 0.9, 2.77 et 5.3 présentent des oscillations dues à la modulation J. (Cas de l'huile de noix).**

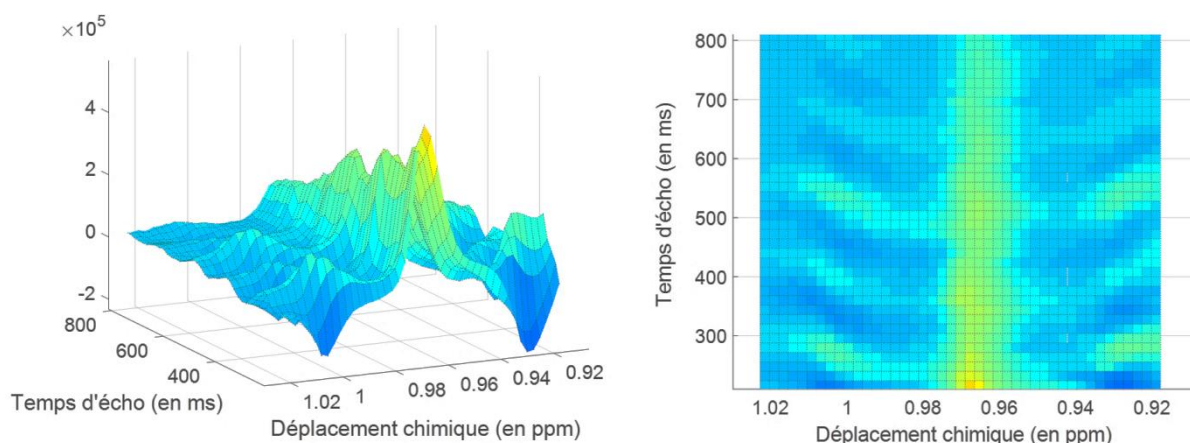
Toutefois quand nous essayons de séparer le méthyl lié aux omégas-3 (0,97 ppm) de celui des autres acides gras (0,90 ppm), nous pouvons constater une plus forte modulation pour le pic à 0,97 ppm que pour le groupement à 0,90 ppm (figure 4.10). Par transformée de Fourier de ce signal, nous avons mesuré un couplage J de 7,35 Hz. Ces J-modulations peuvent affecter l'estimation du T2 et de l'amplitude A0 du pic lié aux omégas-3 et donc altérer la quantification. Le multiplet centré à 0,90 ppm ne laisse visible qu'un pic au-delà d'un TE de 80ms.



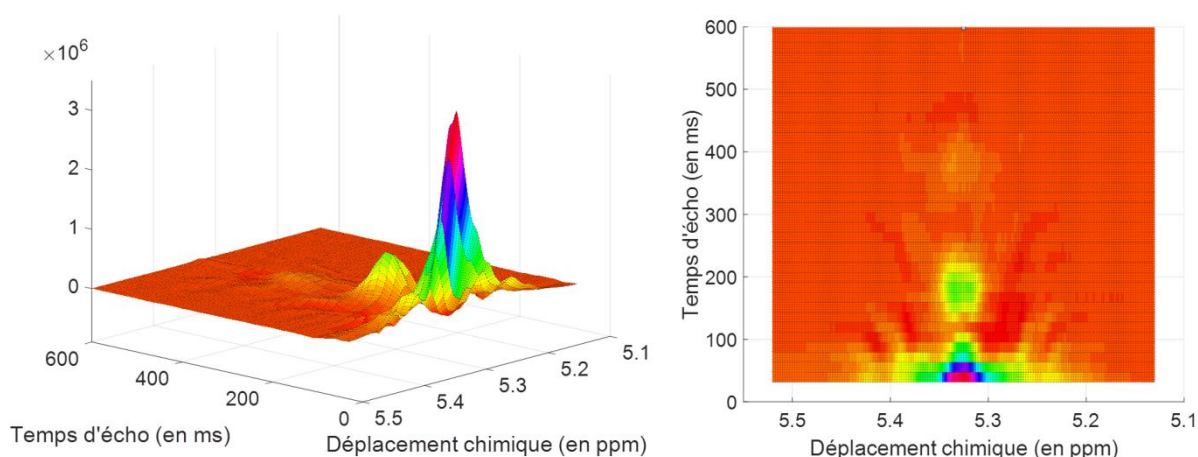


**Figure 4.10** : Evolution de l'aire sous la courbe (ASC) des différents pics de résonance (A, méthyl de 0,88 à 0,92 ppm ; B, méthyl des omégas-3 de 0,95 à 0,99 ppm). Les ASC du pic 0,97 présente de fortes oscillations dues à la modulation J. Pour les TE plus petit que 200 ms, l'ASC de pic0.97 peut être entaché par le multiplet avoisinant. (Cas de l'huile de noix avec 7,69 % d'omégas-3). Les points bleus représentent les échos pris pour le calcul de la proportion d'omégas-3.

Les figures 4.11 et 4.12 montrent une visualisation 3D des spectres acquis à différents TE pour le groupement de méthyl et d'oléfinique.



**Figure 4.11** : Visualisation 3D et 2D de l'amplitude du spectre dans la région 0,92-1,02 ppm (méthyl des  $\omega_3$ ). La J-modulation fait osciller l'intensité du signal en fonction du TE. La variation des pics secondaires forme ici un angle de  $53,7^\circ$  avec l'axe principal.



**Figure 4.12 : Visualisation 3D et 2D de l'amplitude du spectre dans la région 5,10 - 5,55 ppm (oléfinique). La J-modulation fait osciller l'intensité du signal en fonction du TE.**

La prise en compte des couplages J dans la simulation de spectre permettrait de créer des spectres plus réalistes. Cependant, ceci nécessite de les caractériser, par exemple, avec une séquence de spectroscopie 2D J-résolue (Dreher et Leibfritz 1995) et une séquence COSY pour identifier les résonances couplées. Il existe aussi des codes Matlab permettant de faire des simulations avec le formalisme quantique comme Spinach (<http://spindynamics.org/Spinach.php>) et de tester l'effet des impulsions RF sur l'évolution du signal. Cependant, ici le système de spins est très complexe et n'a pas pu être modélisé avec Spinach. En l'absence de caractérisation, nous avons simulé les couplages J avec le site [www.nmrdb.org](http://www.nmrdb.org) (tableau 4.4) qui est un simulateur de spectre RMN à partir d'une molécule définie.

**Tableau 4.4 : Récapitulatif des valeurs des couplages scalaires J entre le système de spin A et le système B.**

A	B	J <sub>AB</sub> (en Hz)
CH= (5,3 ppm)	CH= (5,3 ppm)	15,65
CH= (5,3 ppm)	CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH (2,8 ppm)	6,86
CH= (5,3 ppm)	CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (2,1 ppm)	6,93
CH= (5,3 ppm)	CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (2,03 ppm)	7,36
CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (0,97 ppm)	CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (2,1 ppm)	7,54
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (0,90 ppm)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	7

## 4.2. J-édition (MEGA-PRESS)

Nous avons vu dans la partie précédente que la modulation due au couplage scalaire J pouvait perturber l'estimation de la proportion d'oméga-3. Dans cette optique, nous avons alors pensé à utiliser une séquence de J-édition afin d'exploiter le couplage J pour détecter de manière sélective le signal de certaines résonances (2,8 ppm et 0,97 ppm).

Récemment, Lindeboom et de Graaf ont utilisé une séquence MEGA-sLASER sur le tissu adipeux et dans le muscle chez l'humain afin d'estimer la proportion de polyinsaturés (Lindeboom et de Graaf 2018). Le but était de découpler les spins résonants à 5,3 ppm de ceux résonants à 2,8 ppm. Pour cela, la résonance à 5,3 ppm est saturée en appliquant une impulsion de refocalisation sélective en fréquence (spectre ON) puis une nouvelle acquisition est réalisée en déplaçant l'impulsion sur une partie du spectre sans résonance (spectre OFF). La soustraction des deux spectres permet alors de conserver seulement les pics de résonance couplés au pic de 5,3 ppm.

Sur le même principe, il est possible de conserver seulement le pic d'oméga-3 en supprimant le pic à 0,90 ppm. Le pic de méthyl à 0,90ppm est couplé au (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> résonant autour de 1,3 ppm. Cependant, lorsqu'il y a une double liaison sur le troisième carbone, le groupement de CH<sub>2</sub> ne résonne plus à 1,3 ppm mais à 2,1 ppm. Nous pouvons alors imaginer saturer le pic à 2,1 ppm pour le spectre ON (Škoch, Tošner, et Hájek 2014).

Dans un premier temps, la séquence MEGA-PRESS a été implémentée sur l'imageur préclinique à partir de la séquence PRESS de base et des travaux de référence (Mescher et al. 1998). La modification consiste à ajouter deux impulsions de refocalisation à 180° et sélectives en fréquence avant et après la dernière impulsion 180° sélective spatialement de la séquence PRESS initiale (figure 4.13). L'ajout des deux impulsions sélectives en fréquence rallonge le TE minimum. De plus, si nous voulons que la bande passante de l'impulsion soit assez fine pour ne sélectionner qu'une résonance, ceci implique une augmentation de la durée d'application de l'impulsion ce qui impacte également le TE minimum.

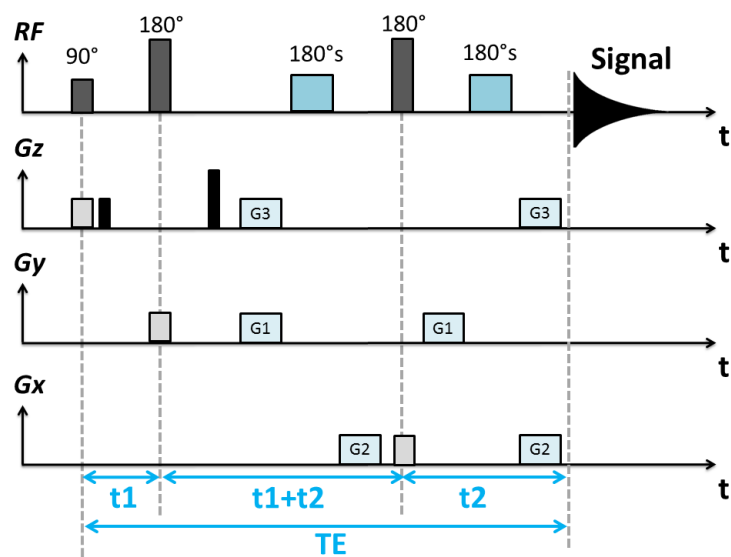
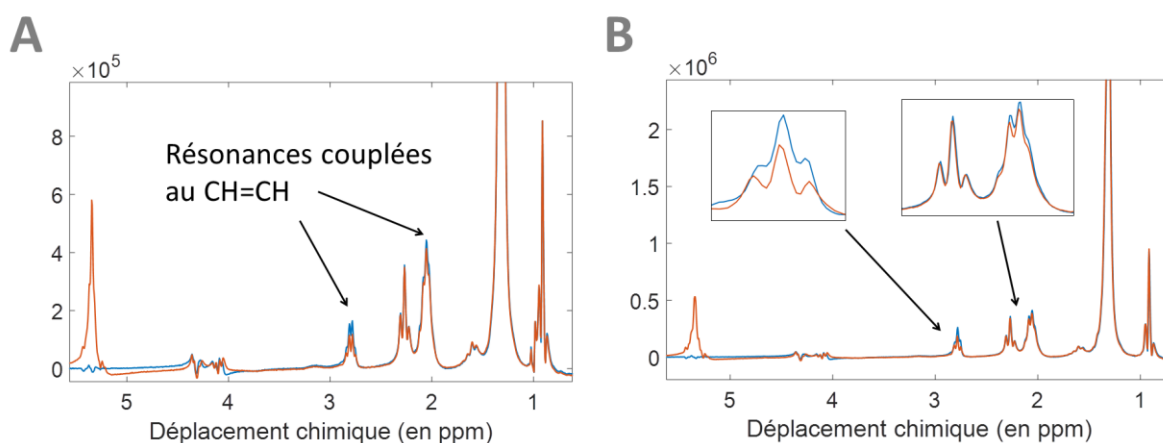


Figure 4.13 : Chronogramme de la séquence MEGA-PRESS. Les ajouts de gradients et d'impulsions RF apportés à la séquence PRESS sont représentés en bleu. Les impulsions de 180° représentent les impulsions sélectives en fréquence du module MEGA. Figure modifiée à partir de (Mescher et al. 1998).

#### 4.2.1. Application de la MEGA-PRESS en ciblant les groupements liés à la poly-insaturation

Nous avons testé la séquence en saturant le pic de 5,3 ppm en utilisant l'impulsion sélective avec un offset de 800 Hz par rapport au pic de méthylène (impulsion MEGA de forme gaussienne : bande passante de 322 Hz, temps d'application de 5 ms), comme proposé dans les travaux de (Lindeboom et de Graaf 2018). Cependant, nous avons été confrontés à des différences de phases entre les deux acquisitions (ON, OFF). Pour pouvoir faire une soustraction, il faut que les deux spectres ne diffèrent que du fait du découplage. Malheureusement, sur nos données la soustraction présentait de nombreux résidus de pics dus à un recalage des spectres imparfaits. Cependant, en comparant les deux spectres 'ON' et 'OFF', nous pouvons observer un rehaussement (attendu) de l'amplitude des pics résonants à 2,8 ppm et 2,1 ppm (figure 4.14), qui serait lié au phénomène de découplage. Nous pouvons aussi relever des effets sur les pics à 4,2 et 4,3 ppm ( $-\text{CH}_2\text{-COO-}$ ) liés au pic à 5,2 ppm ( $-\text{CH-COO-}$ ) saturé en même temps que la résonance à 5,3 ppm.

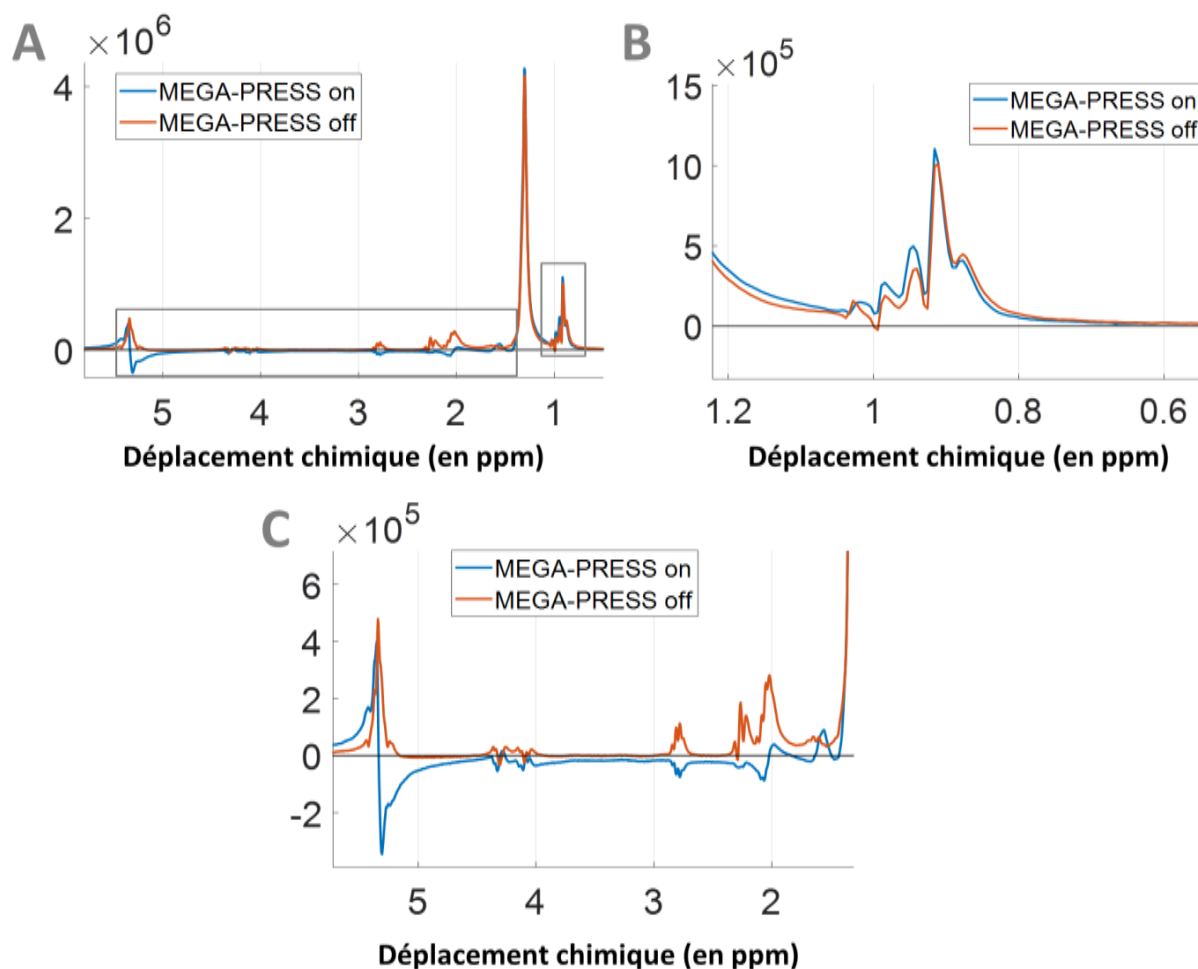


**Figure 4.14** : Spectres acquis avec une séquence MEGA-PRESS (TE = 35 ms, TR = 5 s, 8 accumulations) sur l'huile de noix (A) et l'huile de sésame (B). Les spectres 'ON' avec l'activation du module MEGA sont représentés en bleu et les spectres 'OFF' en orange (impulsion MEGA avec atténuation à 150 dB). Nous observons un rehaussement du signal pour les pics à 2,8 ppm et 2,1 ppm qui sont couplés avec le pic à 5,3 ppm.

#### 4.2.2. Application de la MEGA-PRESS en ciblant les groupements liés aux oméga-3

Après avoir testé la séquence sur le pic de 5,3 ppm, nous pouvons imaginer l'utiliser avec un offset de 160 Hz correspondant à la différence fréquentielle à 4,7T entre le pic à 2,1 ppm (CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) et le pic de méthylène à 1,3 ppm. Le but est d'observer un rehaussement au niveau du pic de méthyl des oméga-3. Une des contraintes principales ici est qu'au voisinage du pic à 2,1 ppm, résonnent d'autres groupements de protons. Il s'agit alors de trouver un bon compromis entre la largeur de la bande passante (BP) et la durée d'impulsion MEGA. Par exemple, une impulsion gaussienne de 60 ms nous permettait de réduire la BP à 26 Hz soit 0,13 ppm à 4,7T. Nous voulons distinguer le groupement de méthyl des oméga-3 par rapport aux autres, l'un étant couplé au groupement résonnant à 2,1 ppm et l'autre à celui à 1,3 ppm (cf tableau 4.4). Ainsi, nous pouvons utiliser une impulsion beaucoup plus courte de 8 ms, de bande passante de 201 Hz, soit 1 ppm à 4,7T en veillant à ne pas affecter le pic à 1,3 ppm qui peut s'étaler de 1,16 à 1,46 ppm. La figure 4.15 nous montre un rehaussement de signal dans la région de la résonance à 0,97 ppm. Nous observons également un effet sur le pic d'oléfinique à 5,3 ppm sûrement dû au fait que la résonance à 2,03 ppm couplée au 5,3 ppm soit aussi saturée par l'impulsion de refocalisation de la séquence MEGA. La ligne de base dans la région excitée (Figure 4.15 C) sur le spectre ON n'est pas plate et diffère de façon notable du spectre OFF augmentant la difficulté de l'interprétation de la soustraction des deux spectres. Un pic à 1,56 ppm apparaît sur le spectre 'ON' légèrement décalé par rapport au pic attribué au groupement -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO- résonnant

ici à 1,62 ppm (Figure 4.15 C) qui lui est couplé à la résonance 2,23 ppm aussi impacté par l’impulsion de refocalisation de la séquence MEGA.

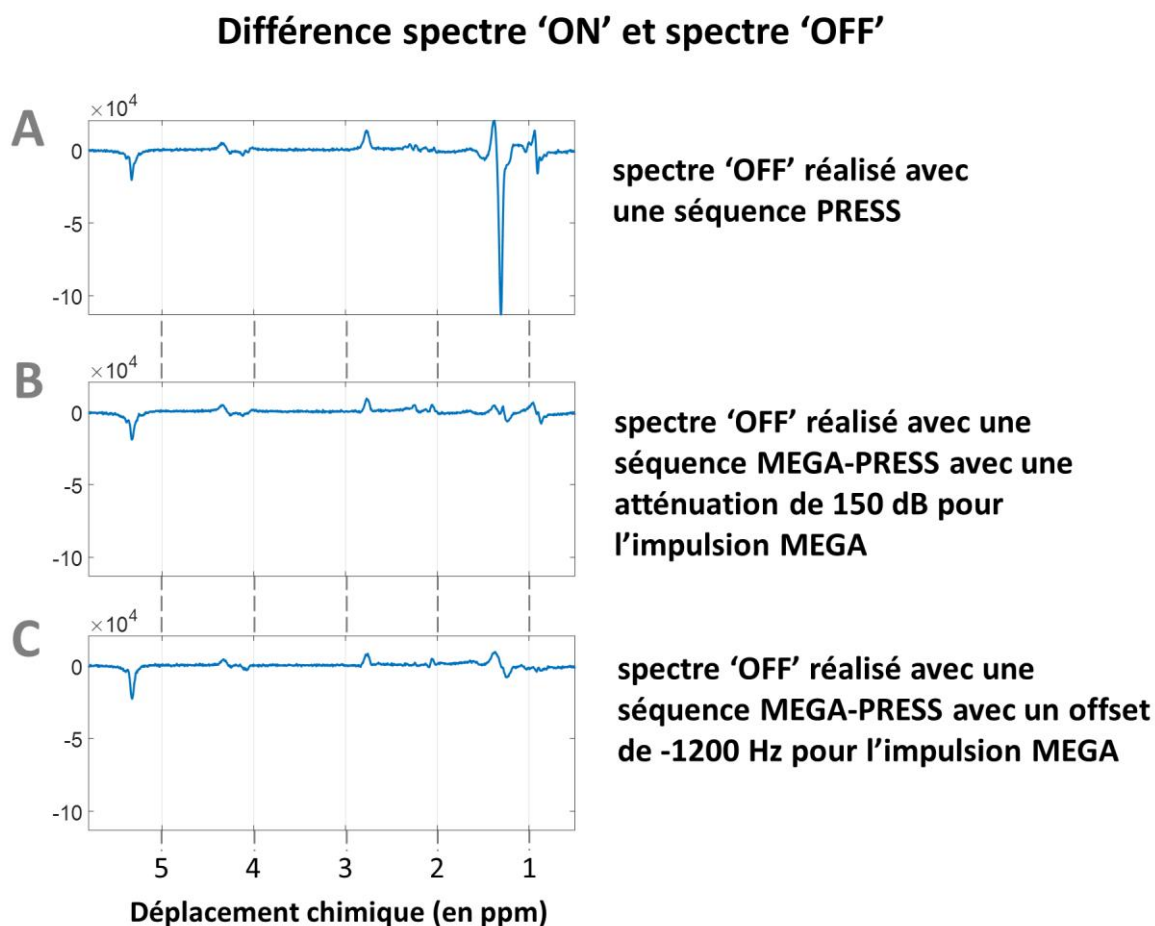


**Figure 4.15** : Spectres acquis avec une séquence MEGA-PRESS (TE = 33 ms, TR = 5 s, 8 accumulations) sur l’huile de colza : A) spectre de 0,5 à 5,8 ppm, B) zoom sur les groupements de méthyles et C) zoom sur la région 1,3 à 5,8 ppm. Les spectres ‘ON’ avec l’activation du module MEGA sont représentés en bleu et les spectres ‘OFF’ en orange (impulsion MEGA avec une atténuation à 150 dB). Nous observons un rehaussement du signal pour le multiplet centré à 0,97 ppm.

### 4.2.3. Implémentation du spectre OFF

Il existe plusieurs possibilités de faire un spectre ‘OFF’ : soit en prenant la séquence PRESS initiale en veillant à respecter les durées  $t_1$  et  $t_2$  (figure 4.13), soit en utilisant les impulsions MEGA en ajustant le facteur d’atténuation pour avoir un angle de bascule de  $0^\circ$ , soit en gardant une impulsion de  $180^\circ$  mais en modifiant l’offset sur une zone du spectre sans résonance. Pour les analyses précédentes, nous avons utilisé une atténuation de 150 dB (angle de bascule  $\sim 0^\circ$ ) pour les spectres ‘OFF’ cependant ce choix peut être remis en question en raison de la présence de résidu anormale après la soustraction des spectres. Nous comparons alors l’impact du choix du spectre ‘OFF’ sur la différence entre les spectres ‘ON’ et ‘OFF’. L’observation faite ci-après a été réalisée sur une unique session et devrait faire l’objet d’une

étude plus systématique. L'utilisation de la séquence PRESS de base pour faire le spectre 'OFF' ne semble pas être une bonne idée car il persiste un plus grand résidu au niveau du pic à 1,3 ppm en comparant avec une impulsion MEGA d'atténuation 150 dB ou avec un offset de -1200 Hz (figure 4.16). L'utilisation d'une impulsion MEGA avec un offset éloigné de toutes résonances semble être l'option qui présente le moins d'artéfacts avec le plus faible résidu au niveau des résonances proches de 1 ppm mais un résidu persiste au niveau dans la région à 1,3 ppm.



**Figure 4.16 :** Différence entre un spectre 'ON' (séquence MEGA-PRESS, offset = 800 Hz, Bande passante impulsion MEGA = 322 Hz, TE = 70 ms, TR = 5 s, 1 accumulation). Trois différentes façons d'acquérir le spectre 'OFF' ont été testées : avec une PRESS (A), avec une MEGA-PRESS (B, C). Pour le B, l'atténuation de l'impulsion MEGA est mise à 150 dB (angle de 0°), l'offset est inchangé par rapport au spectre 'ON'. Pour le C, seul l'offset est modifié à -1200 Hz par rapport au spectre 'ON'. La présence de tous pics positifs ou négatifs, en dehors des résonances à 5,3, 4,3, 4,2, 2,8 et 2,03 ppm, est considérée comme anormale. L'option C présente *in fine* le moins d'artéfacts.

#### 4.2.4. Conclusion

Grâce à l'utilisation de la MEGA-PRESS nous avons pu voir que la résonance à 5,3 ppm était bien couplée aux résonances à 2,8 ppm et 2,03 ppm de même pour la résonance à 2,1 ppm avec le groupement de méthyl des omégas-3 à 0,97 ppm. Cependant, il semble

difficile à ce stade de faire de la quantification avec les spectres acquis à cause d'une différence de phase entre les deux spectres 'ON' et 'OFF'. Si visuellement, le recalage des spectres peut paraître bon, la différence des deux spectres montre souvent des résidus importants au niveau de la résonance centrale ici le pic à 1,3 ppm. Ceci est d'autant plus problématique que dans le cas des omégas-3, la résonance du méthyl résonne proche du pic à 1,3 ppm. Précédemment, nous avons évoqué l'utilisation d'une séquence J-résolue. Avec une séquence COSY pour caractériser les corrélations des résonances, nous pourrions aussi implémenter le module MEGA sur ces deux séquences pour essayer de faire de spectroscopie 2D J-édition.

### **4.3. Imagerie spectroscopique EPSI : Comparaison avec la séquence MGE et la séquence PRESS**

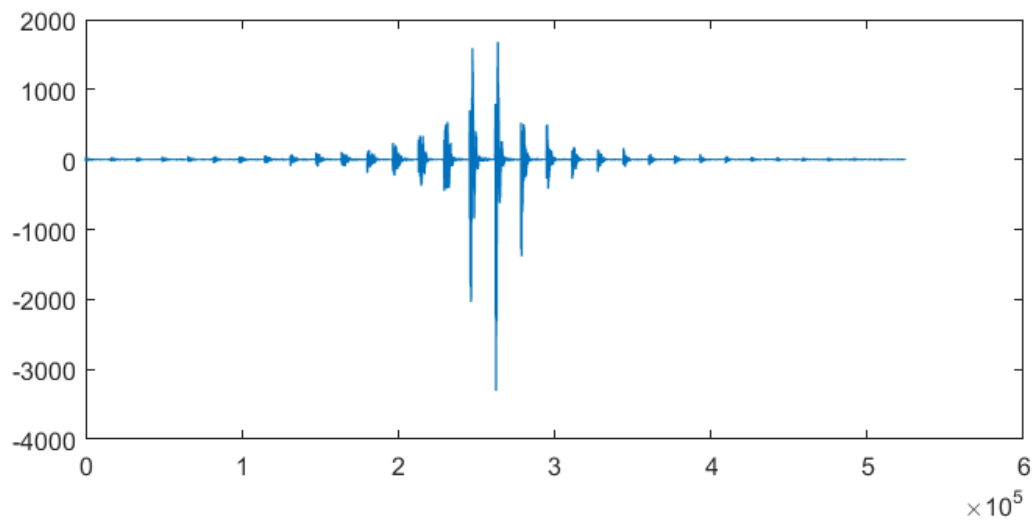
Nous avons vu dans le chapitre 3 qu'il était possible de remonter aux paramètres *ndb* et *nmidb* avec une séquence multi-écho de gradient (MGE) et un traitement post-acquisition dédié. Dans ce cas-là, le signal était faiblement échantillonné temporellement (8 échos) et ne permettait pas de reconstituer un spectre résolu comme en SRM. Cependant, le spectre reste un outil intéressant, il permet une inspection visuelle et une distinction des différentes résonances notamment celles liées aux omégas-3 comme vu précédemment. Dans le but de faire de l'imagerie des omégas-3, pouvoir disposer d'une séquence d'imagerie qui permette un échantillonnage temporel pour avoir un spectre suffisamment résolu serait un atout. Nous parlons alors d'imagerie spectroscopique. Une des séquences disponibles sur l'imageur préclinique 4,7T est la séquence EPSI (Echo Planar Specoscopic Imaging). Son implémentation est très similaire à la séquence MGE avec des paramètres similaires. Dans cette partie, nous nous attacherons à comparer les deux types de séquences premièrement au niveau de la stratégie de l'acquisition du signal RMN puis au niveau de la quantification. Puis dans la configuration de l'EPSI en écho de spin, nous réaliserons une comparaison avec la séquence PRESS. Notamment, nous proposerons une stratégie d'acquisition pour évaluer la proportion d'omégas-3.

#### **4.3.1. Lecture et correction du signal provenant de la séquence EPSI**

Un programme de lecture des données acquises a dû être créé pour pouvoir analyser les données. Dans un premier temps, il consiste à redistribuer le signal brut (figure 4.17, TE = 20 ms) pour remplir l'espace des k afin d'avoir une image complexe pour chaque

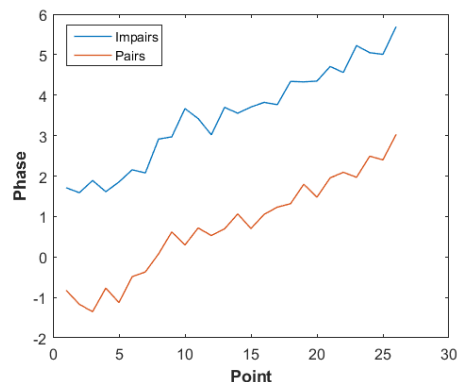


temps  $t$  de l'échantillonnage spectroscopique. Puis des corrections pour corriger le spectre sont appliquées.



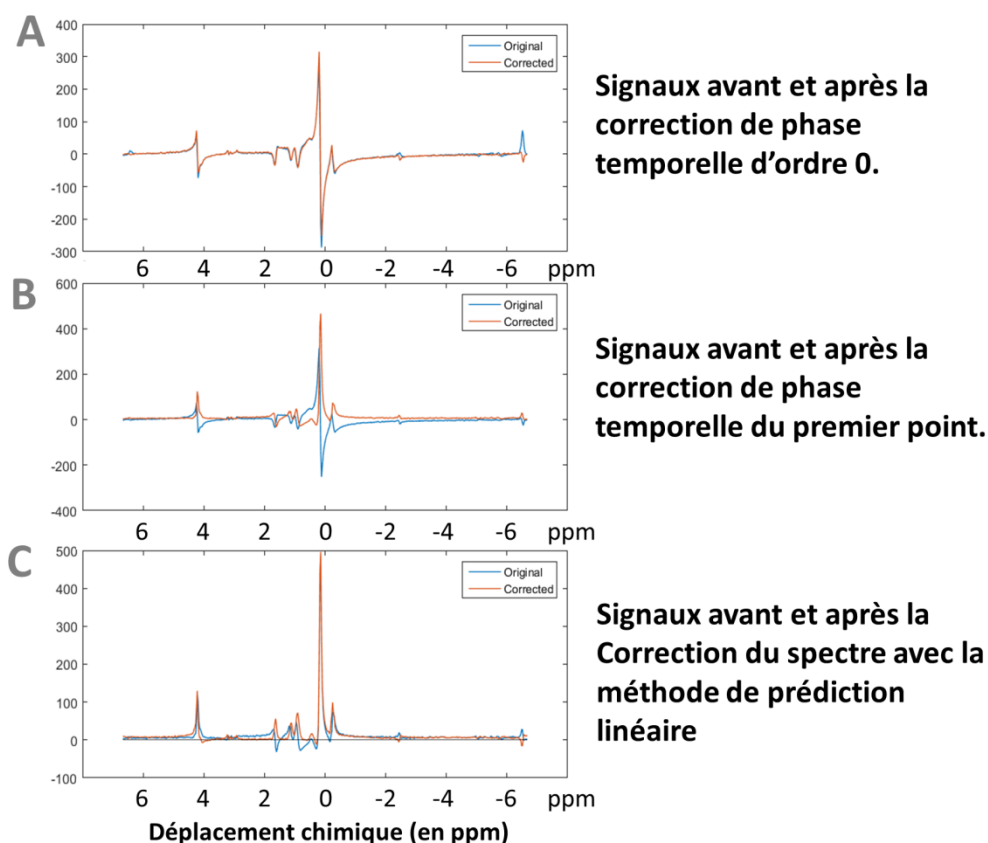
**Figure 4.17 : Signal brut acquis avec la séquence EPSI**

Dans un premier temps, nous effectuons une correction de la phase temporelle d'ordre zéro. En effet, les échos pairs et impairs n'ont pas la même phase temporelle d'ordre zéro (figure 4.18) dû aux gradients de lecture dont la polarité est positive dans un cas et négative dans l'autre.



**Figure 4.18 : Déroulement des premiers points de la phase temporelle.**

La correction consiste à approximer par une droite les premiers points de la phase déroulée pour les échos pairs d'un côté et impairs de l'autre. Nous récupérons alors la phase d'ordre zéro des deux signaux ( $\varphi_{01}$  et  $\varphi_{02}$ ) et corrigeons les échos pairs en multipliant par  $\exp(i(\varphi_{01} - \varphi_{02}))$  (figure 4.19 A). Une fois que tous les échos ont la même phase d'ordre zéro, nous les corrigeons en les multipliant par la phase temporelle du premier point (figure 4.19 B).



**Figure 4.19 : Les différentes étapes de la correction du spectre.**

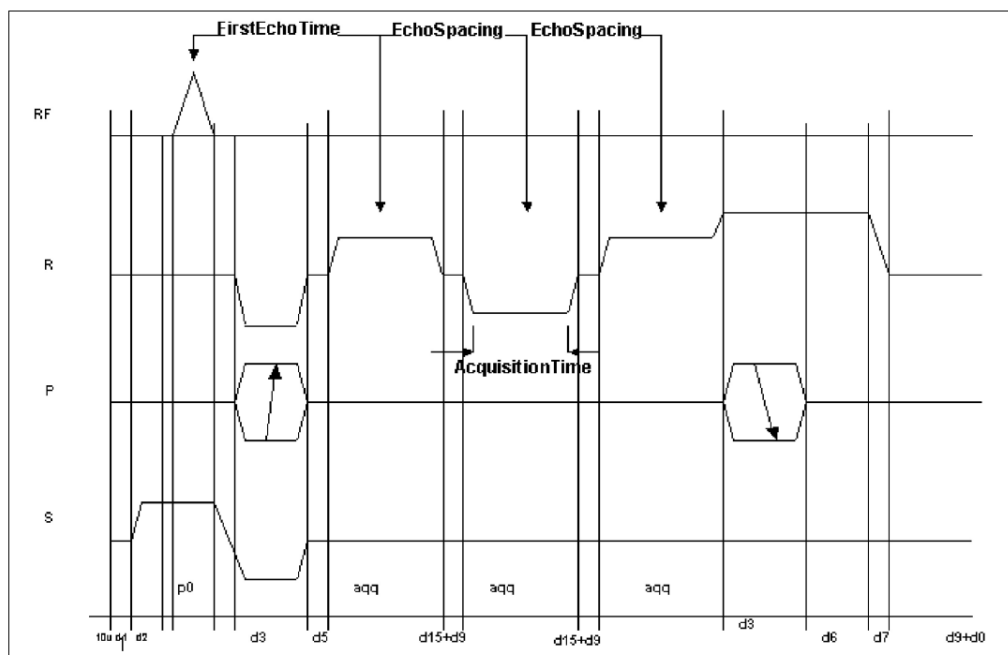
Il reste cependant encore des distorsions dans le spectre reconstruit. Celles-ci sont dues au fait que le TE et le TE effectif sont différents. Dans le cas présenté ici, le TE est égal à 20 ms alors que le TE effectif est de 21,18 ms. Nous appliquons donc une correction afin de reconstruire les premiers points manquants, nous utilisons pour cela une « prédiction linéaire » (figure 4.19 C).

### 4.3.2. Comparaison de la séquence EPSI-FID avec la séquence MGE

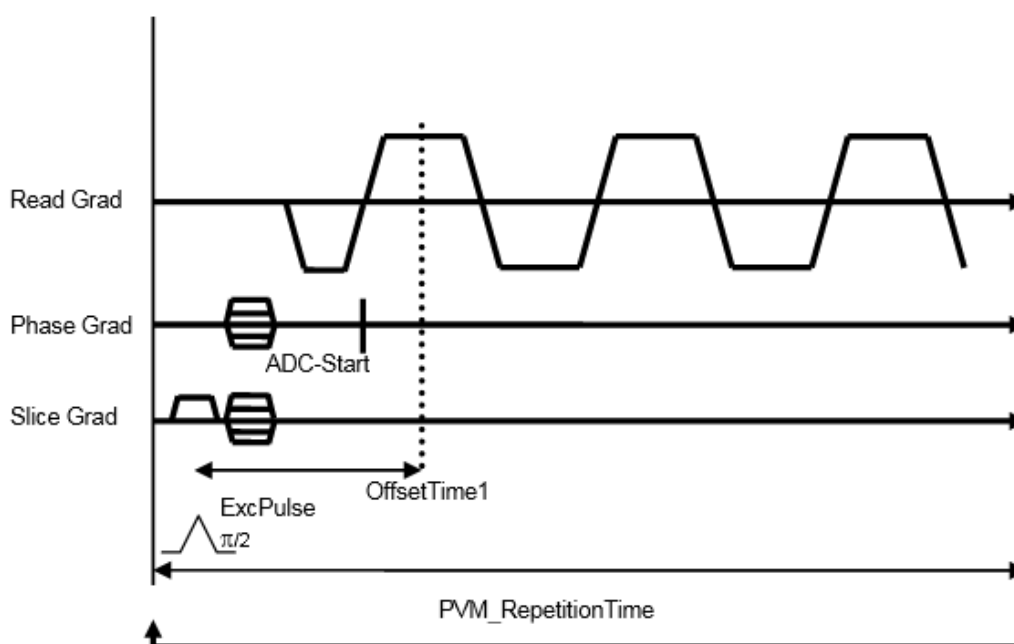
La comparaison des deux séquences se fait à plusieurs niveaux : 1) sur les chronogrammes et 2) sur le signal acquis.

#### 4.3.2.1. Comparaison des chronogrammes

Les séquences MGE et EPSI-FID (dans sa configuration écho de gradient) ont des chronogrammes très similaires en théorie (figure 4.20 et 4.21), avec un gradient oscillant dans la direction de la lecture afin d'acquérir les différents échos (utilisation de gradient bipolaire).



**Figure 4.20 : Chronogramme de la séquence multi-écho de gradient (MGE) avec l'utilisation de gradient bipolaire, extrait de la documentation de Bruker.**



**Figure 4.21 : Chronogramme de la séquence EPSI en mode écho de gradient, extrait de la documentation de Bruker.**

Cependant, sur l'imageur préclinique Bruker, l'EPSI diffère par la possibilité de réduire le  $\Delta TE$  (« echo spacing ») entre deux échos permettant alors une meilleure résolution spectrale. Pour cela, à résolution spatiale égale, des points sont acquis pendant la montée et la descente des gradients. Dans l'implémentation de la séquence MGE (figure 4.20), un délai ( $\sim 1$  ms) est appliqué entre deux gradients de lecture ce qui augmente un peu plus le  $\Delta TE$  minimum. En revanche, la séquence MGE permet d'avoir un TE minimum plus petit que pour la séquence EPSI. En effet, dans l'implémentation de cette dernière (figure 4.21), le gradient

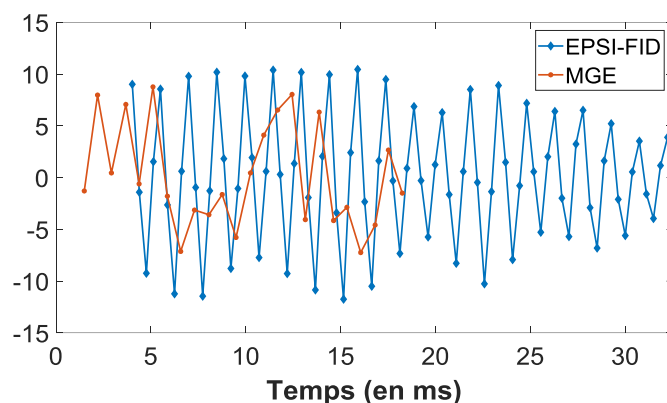
de déphasage appliqué suivant la lecture n'est pas appliqué en même temps que le gradient de phase, ce qui est le cas dans la MGE.

#### **4.3.2.2. Paramètres d'acquisition**

Dans le contexte de la quantification lipidique, nous souhaitons appliquer les mêmes méthodes d'analyse que celles utilisées dans les chapitres précédents pour la séquence MGE (ou encore appelée CSE-MRI). A 4,7T, le  $\Delta TE$  recherché (équation 1.27 chapitre 1) est de 0,73 ms (noté  $\Delta TE_{th}$ ). La séquence MGE de l'IRM préclinique ne nous permet pas d'atteindre ce temps inter-écho de 0,73 ms. Nous sommes donc obligés de faire trois acquisitions et d'entrelacer les échos afin d'obtenir un écart effectif de 0,73 ms entre les échos. Pour la MGE, chaque train d'échos comprend 8 échos, le  $\Delta TE$  était de 2,19 ms, le 1<sup>er</sup> TE est respectivement de 1,49 ms ( $\sim 2 \times \Delta TE_{th}$ ), 2,19 ms ( $3 \times \Delta TE_{th}$ ), et 2,92 ms ( $4 \times \Delta TE_{th}$ ) pour les trois acquisitions. Pour l'EPSI-FID, il est possible de faire un pas plus fin, nous avons donc choisi un  $\Delta TE$  de 0,371 ms (soit  $\sim \Delta TE_{th}/2$ ) avec le maximum de points soit 512. Cependant, le 1<sup>er</sup> TE de l'EPSI-FID est fixé à 4,02 ms ( $5,5 \times \Delta TE_{th}$ ). La géométrie est identique pour les deux séquences : épaisseur de coupe de 2 mm, taille de la matrice de 64 x 64 et champ de vue à 32 x 32 mm<sup>2</sup>. L'écho de gradient est réalisé avec une impulsion RF à 90°, l'effet du T1 n'est donc pas négligeable, cependant ici nous travaillons sur des huiles pures dont le T1 est plus court que l'eau ( $\sim 500$  ms). Pour les deux séquences, le TR est de 1,5 s et deux accumulations du signal sont réalisées. Ce protocole a été appliqué sur un fantôme constitué de deux tubes d'huiles de noix et de colza (1,2 cm de diamètre et 7,5 cm de longueur) plongés dans un tube d'eau (2,8 cm de diamètre et 11,5 cm de longueur).

#### **4.3.2.3. Comparaison des signaux acquis**

Les échos des deux séquences ne correspondent pas parfaitement, cependant l'amplitude du signal semble équivalent au plus proche voisin (figure 4.22). Nous constatons cependant, que le pas d'échantillonnage choisi pour la séquence MGE entrelacée ne permet pas de suivre correctement les oscillations comme celles observables avec la séquence EPSI-FID.



**Figure 4.22 : Comparaison de l'évolution du signal avec une séquence EPSI-FID et MGE entrelacé. L'entrelacement des signaux MGE nécessite une correction préalable de la phase des données**

Dans l'optique d'utiliser un traitement post-acquisition qui modélise ces oscillations comme utilisé dans les précédents chapitres, la séquence EPSI-FID serait une meilleure candidate. Avec l'EPSI-FID, le pas d'échantillonnage dans la dimension spectroscopique n'est pas aussi limité qu'en MGE et propose une solution adaptée à la quantification lipidique dans le cas des études à plus au champ pour lequel le  $\Delta T_{E_{th}}$  sera encore plus petit (exemple à 11,7 T,  $\Delta T_{E_{th}} = 0,293$  ms). En préclinique, la séquence EPSI serait donc la plus adaptée.

### 4.3.3. Comparaison des deux motifs d'EPSI : EPSI-FID et EPSI-SE

Dans cette section, nous allons comparer les signaux acquis avec les deux motifs possibles de la séquence EPSI, à savoir avec un écho de spin (EPSI-SE) ou avec un écho de gradient (EPSI-FID).

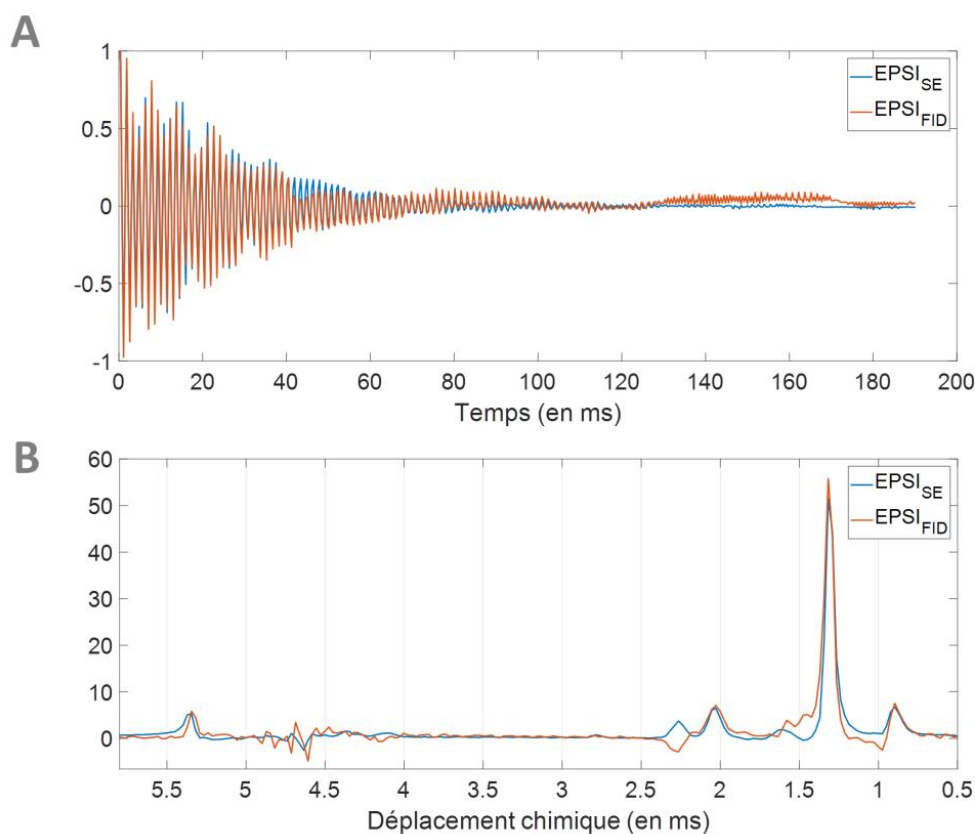
#### 4.3.3.1. Paramètres d'acquisition

Pour comparer les deux types de séquences, nous utilisons des paramètres équivalents : TE de 15 ms, TR de 1,5 s, résolution temporelle de 0,371 ms, 2 accumulations du signal, taille de matrice de 64 x 64, champ de vue de 32 x 32 mm<sup>2</sup>. L'écho de gradient est réalisé avec une impulsion RF d'angle 90°. Ce protocole a été appliqué sur un fantôme constitué de deux tubes d'huiles d'olive et de noisette plongés dans un tube d'eau.

#### 4.3.3.2. Comparaison des signaux acquis

L'utilisation d'un écho de spin à la place d'un écho de gradient permet de refocaliser l'effet des inhomogénéités de champ magnétique. *In vitro*, ces inhomogénéités sont moins importantes qu'*in vivo* et les signaux semblent être équivalents sur les premiers points. Cependant, le signal temporel de l'EPSI-FID présente des modulations d'amplitude à la fin du

signal qui correspond aux derniers échos. Ici, nous avons utilisé un échantillon constitué de deux tubes d'huiles insérés dans un tube d'eau. En utilisant, une excitation d'angle  $90^\circ$  et un TR de 1,5 s, la résonance de l'eau n'a pas le temps de relaxer entièrement. Un résidu de cette résonance pourrait persister au moment de l'encodage spatial. De plus, sur le spectre orange (figure 4.23), nous observons des oscillations autour de la résonance à 4,7 ppm, caractéristiques d'un signal tronqué.



**Figure 4.23 : Comparaison du signal de la séquence Epsi-SE (avec un écho de spin) et Epsi-FID (avec un écho de gradient acquis sur un tube d'huile d'olive plongé dans un tube d'eau. Les paramètres sont identiques : TE = 15 ms, résolution temporelle de 0,371 ms, 2 accumulations du signal, taille de matrice de 64 x 64, champ de vue de 32 x 32 mm<sup>2</sup>. Les amplitudes du signal en temporel (A) et en fréquentiel (B) sont ajustées pour être égales. La décroissance du signal semble similaire dans les deux cas sur les premiers points. Le signal temporel d'Epsi-FID semble présenter une modulation d'amplitude supplémentaire**

Une prochaine étape serait de comparer l'Epsi-FID avec Epsi-SE et MGE dans une configuration plus adaptée à l'étude *in vivo*. Notamment, l'Epsi-FID avec un angle de bascule plus petit permettrait de réduire l'effet du T1 et permettrait d'utiliser des TR plus courts pour réduire les temps d'acquisition (ici de 3 min 12 s pour une coupe). Dans cette configuration, la séquence se rapprocherait plus de celle de MGE utilisée dans les autres chapitres. Dans ce cas, nous pourrions adapter les traitements post-acquisition utilisés dans le troisième chapitre pour modéliser le signal provenant de l'Epsi-FID. L'implémentation de la

séquence EPSI ne semble pas présenter de gradients de brouillage, qui permettrait de déphaser l'aimantation transversale persistante, contrairement à la MGE. Ceci pourrait être une amélioration à apporter à la séquence et permettrait d'utiliser des angles de basculement de l'aimantation et des temps de répétition plus faibles.

#### **4.3.4. Comparaison de la séquence EPSI-SE avec la séquence PRESS**

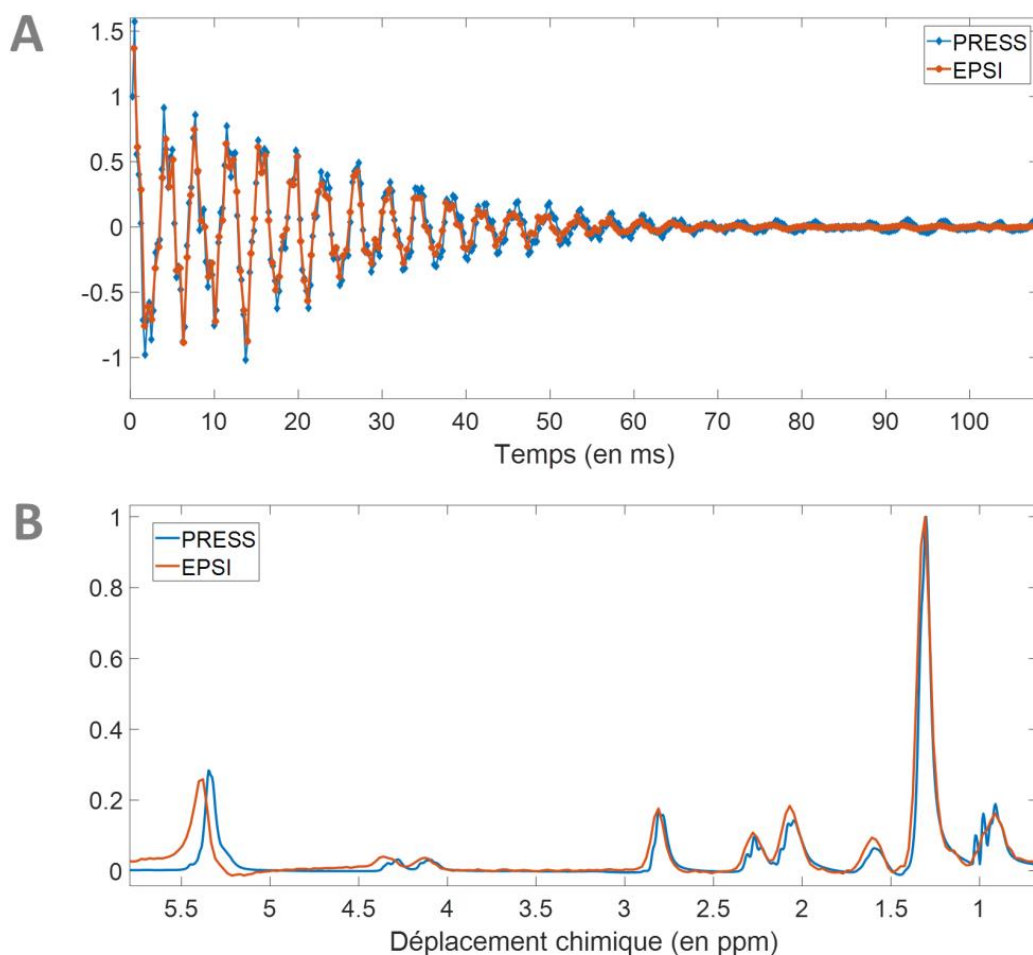
Dans cette section, nous allons comparer les signaux acquis avec la séquence EPSI-SE (avec un motif d'écho de spin) et ceux acquis avec une séquence PRESS (double écho de spin).

##### ***4.3.4.1. Paramètres d'acquisition***

Pour comparer les deux types de séquences, nous utilisons un TE de 10 ms. Pour l'EPSI les paramètres étaient : TR de 1,5 s, 1 accumulation, résolution temporelle de 0,422 ms, 512 points, taille de matrice de 64 x 64, champ de vue de 30 x 30 mm<sup>2</sup>, épaisseur de coupe de 5 mm, temps d'acquisition de 48s. Pour la PRESS les paramètres étaient : TR de 3s, 16 accumulations, résolution temporelle de 0,249 ms, taille du voxel de 5 x 5 x 5 mm<sup>3</sup>. Ce protocole a été appliqué sur un fantôme constitué de trois tubes : d'huiles de lin, de noix et de colza.

##### ***4.3.4.2. Comparaison des signaux acquis***

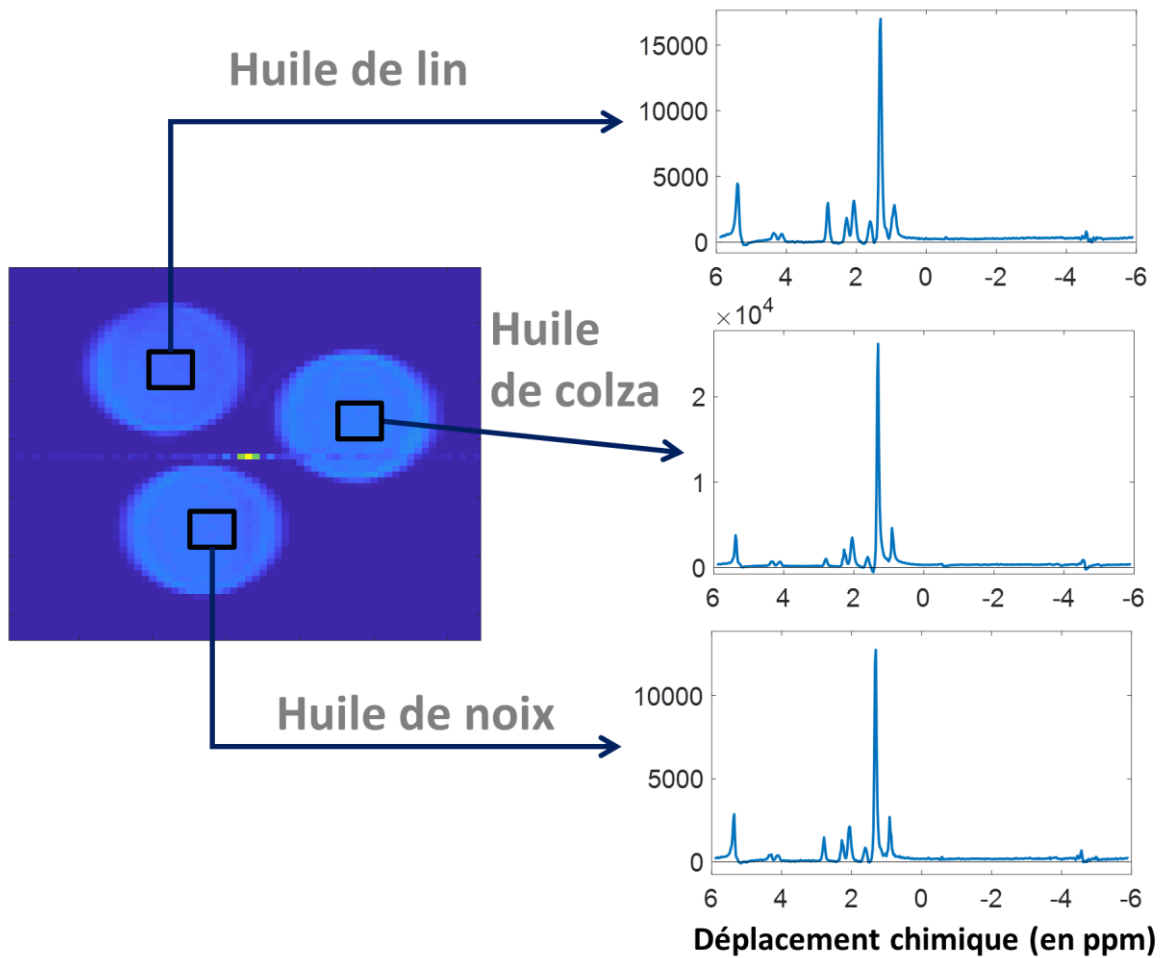
Nous observons sur la figure 4.24, des signaux très similaires entre les deux séquences. Sur le spectre de l'EPSI, le pic à 5,3 ppm est légèrement décalé par rapport à la PRESS.



**Figure 4.24 :** Comparaison du signal de la séquence EPSI-SE ( $TE = 10$  ms, pas d'échantillonnage =  $0,42$  ms/pt) avec la séquence PRESS ( $TE = 15$  ms, pas d'échantillonnage =  $0,24$  ms/pt) sur l'huile de lin. Les amplitudes du signal en temporel (A) et en fréquentiel (B) sont ajustées pour être égales. La décroissance du signal semble similaire dans les deux cas.

Les amplitudes des pics de résonance semblant être très similaires à la PRESS, des traitements équivalents à ceux réalisés dans la première partie de ce chapitre peuvent aussi être appliqués. L'EPSI-SE permet d'avoir *in vitro* des spectres bien résolus comme en témoigne la figure 4.25.





**Figure 4.25 :** EPSI à TE = 10 ms BP = 11,8 ppm TR = 1,5 s, épaisseur de coupe 5 mm, FOV de 30 x 30 mm<sup>2</sup>, matrice de 64 x 64, temps d'acquisition 48s. Le point lumineux au centre de l'image fait état de la présence d'une composante continue dans l'espace de Fourier, cet artefact peut être supprimé en faisant deux accumulations du signal.

Les paramètres utilisés sont un bon compromis entre résolution spatiale et spectrale. Nous allons maintenant essayer de remonter aux paramètres *ndb* et *nmidb* liés à la composition lipidique.

#### 4.3.4.3. Quantification lipidique à partir de la séquence EPSI-SE

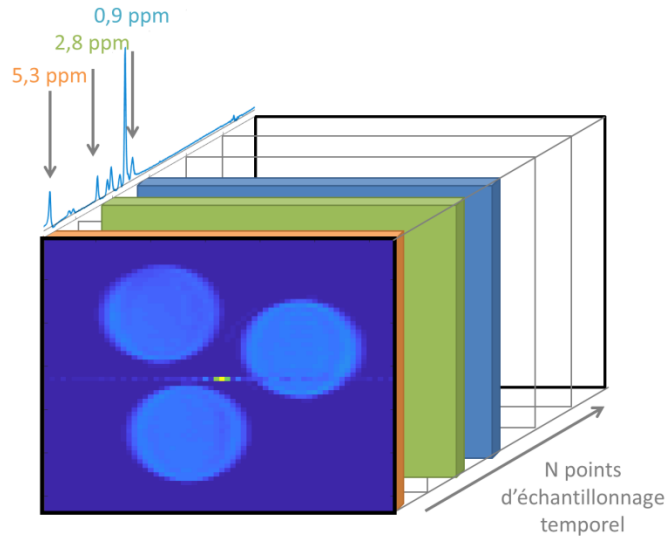


Figure 4.26 : Représentation 3D du signal acquis après transformée de Fourier (TF), les deux premières directions sont pour l'encodage spatial et la dernière offre une résolution temporelle (ou spectrale après TF).

Pour le calcul des cartographies  $ndb$  et  $nmidb$ , nous utilisons la 3<sup>e</sup> dimension dans sa forme fréquentielle (figure 4.26) et détectons les coupes correspondant aux pics d'intérêts (à 5,3, 2,8 et 0,9 ppm). Les coupes sont sommées entre elles de telle sorte à avoir une image correspondante à l'aire sous la courbe du pic à 5,3 ppm pour chaque pixel (de même pour les autres résonances). Par la suite, les cartographies sont estimées comme :

$$nmidb = \frac{A_{pic2,8}}{A_{pic0,9}} \times \frac{9}{2} \quad (4.6)$$

$$ndb = \left( \frac{A_{pic5,3}}{A_{pic0,9}} \times 9 - 1 \right) / 2$$

Une correction en T2 peut être aussi apportée, ainsi les équations deviennent :

$$nmidb_{corT2} = \frac{A_{pic2,8} \times e^{TE/T_{2,8}}}{A_{pic0,9} \times e^{TE/T_{2,9}}} \times \frac{9}{2} \quad (4.7)$$

$$ndb_{corT2} = \left( \frac{A_{pic5,3} \times e^{TE/T_{2,5,3}}}{A_{pic0,9} \times e^{TE/T_{2,0,9}}} \times 9 - 1 \right) / 2$$

Les cartographies  $ndb$  et  $nmidb$  sans correction en T2 des trois huiles (lin, colza et noix) sont présentées dans la figure 4.27. Les T2 utilisés dans la correction sont tirés de la première partie de ce chapitre avec  $T_{2,8} = 50,6$  ms,  $T_{2,5,3} = 43,6$  ms et  $T_{2,0,9} = 47,8$  ms.

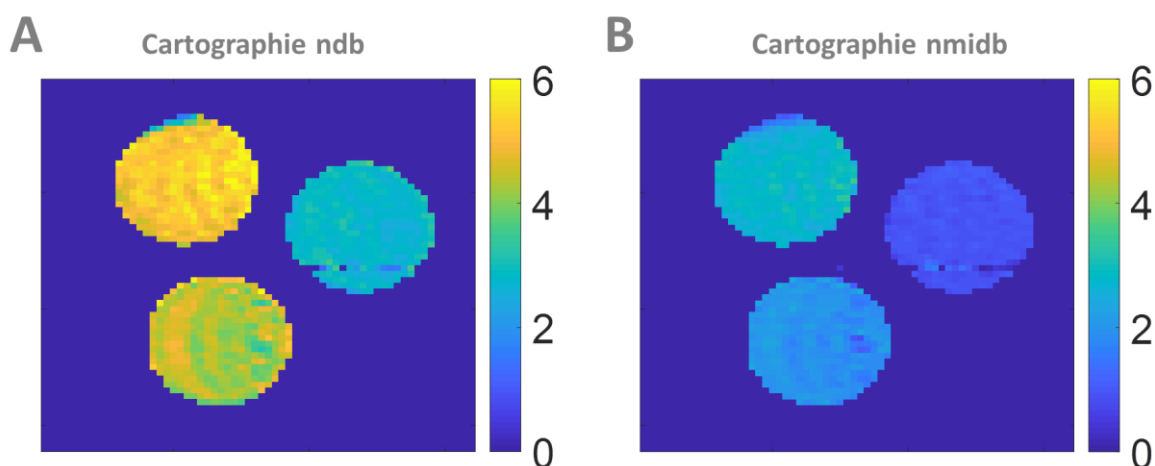


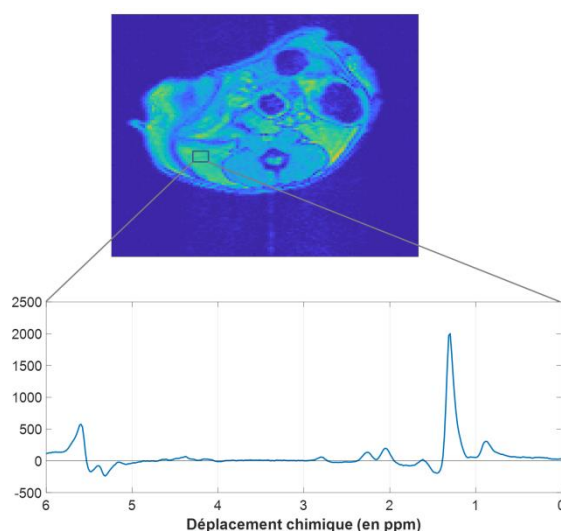
Figure 4.27 : Cartographies *ndb* et *nmidb* estimées à partir d’une acquisition EPSI-SE (TE = 10 ms BP = 11,8 ppm TR = 1,5 s, épaisseur de coupe 5 mm, FOV de 30 x 30 mm<sup>2</sup>, matrice de 64 x 64, temps d’acquisition 48s)

Nous obtenons alors des résultats cohérents avec ceux de la chromatographie en phase gazeuse (tableau 4.5).

Tableau 4.5 : Comparaison des valeurs de *ndb* (nombre de double liaison) et *nmidb* (nombre de méthylène interrompant des doubles liaisons) estimées grâce à la séquence EPSI (avec et sans correction de T2) et par chromatographie en phase gazeuse.

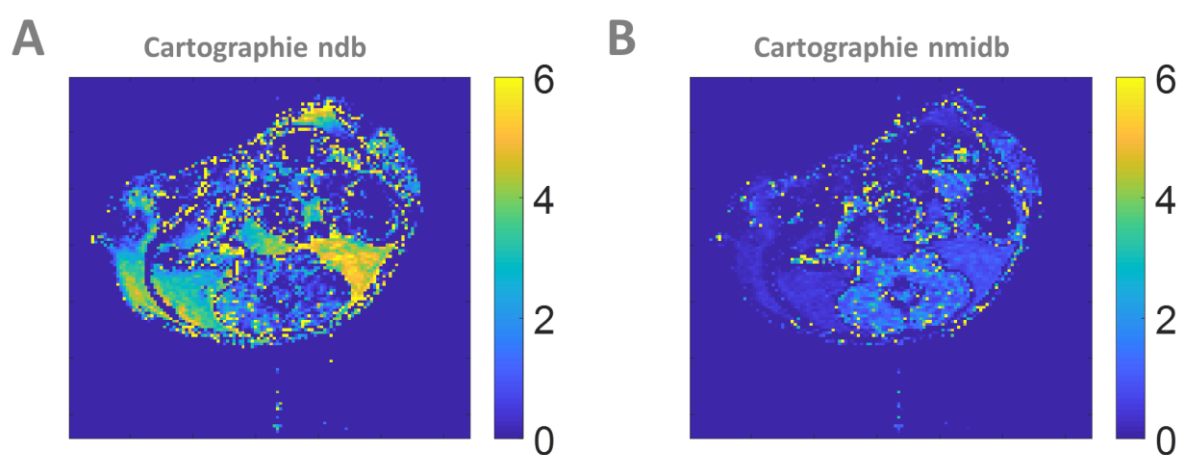
Huiles	Chromatographie en phase gazeuse	EPSI (sans correction T2)	EPSI (avec correction T2)
ndb			
noix	4,35	4,10	4,20
colza	3,35	2,71	2,77
lin	5,22	5,22	5,34
nmidb			
noix	1,73	1,95	1,93
colza	0,63	0,95	0,94
lin	2,63	2,83	2,80

Ici dans le cas où nous avons un très bon SNR pour les spectres issus de l’EPSI, il est possible de remonter aux cartographies *ndb* et *nmidb* sans utiliser l’ajustement de modèle avec contraintes comme pour la MGE. Nous avons alors testé une séquence EPSI-SE *in vivo* sur une souris saine de masse 37g, à noter que dans ce cas le SNR n’est pas aussi élevé qu’*in vitro*. Pour avoir une meilleure résolution spatiale nous avons augmenté le nombre de points dans la matrice d’encodage (de 64 à 128) et nous avons alors diminué la bande passante jusqu’à 8,48 ppm (figure 4.28).



**Figure 4.28 :** Le premier écho de la EPSI-SE (TE = 15 ms, TR = 1,5 s, 2 accumulations, 1 coupe de 2 mm, BP = 8,48 ppm, résolution spatiale = 0,25 x 0,25 mm<sup>2</sup>, taille de matrice = 128 x 128, résolution spectrale = 3,3 Hz/pts, temps d'acquisition = 6,4 min) est représenté avec le spectre correspondant à une région définie manuellement.

La ligne de base sur le spectre de la figure 4.28 n'est pas bien alignée dans la région du pic à 5,3 ppm qui semble être déphasé par rapport au reste du spectre. Tout comme sur les huiles, il est possible de remonter aux cartographies *ndb* et *nmidb* (figure 4.29).



**Figure 4.29 :** Cartographies *ndb* et *nmidb* estimées à partir d'une acquisition EPSI-SE (TE = 15 ms, TR = 1,5 s, 2 accumulations, 1 coupe de 2 mm, BP = 8,48 ppm, résolution spatiale = 0,25 x 0,25 mm<sup>2</sup>, résolution spectrale = 3,3 Hz/pts, temps d'acquisition = 6,4 min) sur une souris saine de 37g.

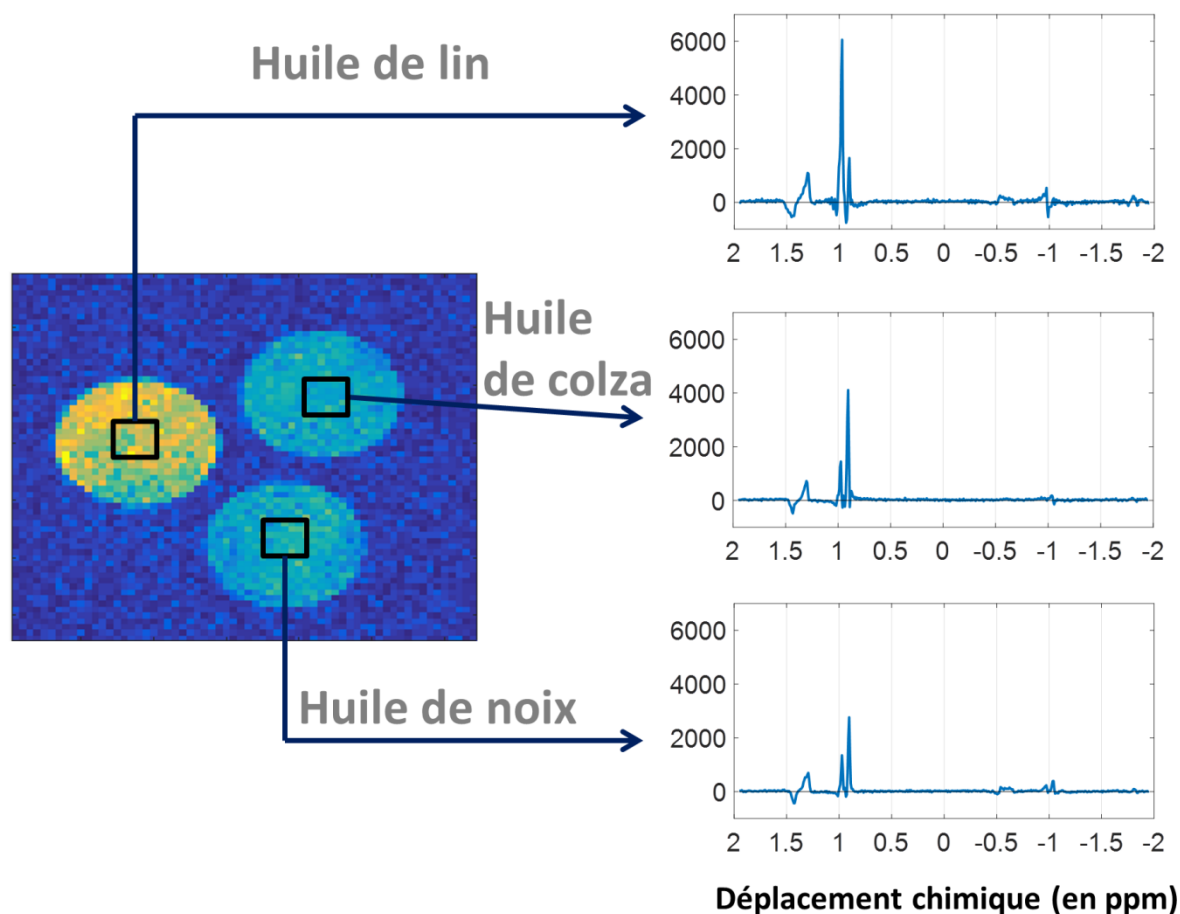
Sur les cartographies nous observons des variations spatiales dans les valeurs calculées. Les valeurs de *ndb* semblent être surestimées, certainement à cause d'une surestimation de l'aire sous la courbe du pic à 5,3 ppm qui n'est pas parfaitement aligné avec la ligne 0. Sur la partie gauche des cartographies, les valeurs de *ndb* et *nmidb* semble être cohérentes avec ce qui est attendu : *ndb* de 3,36 et *nmidb* de 0,78 (proportion de polyinsaturés

proche de 23% et de mono-insaturés proche de 60 % (Strobel, Hoff, et Pietzsch 2008)). Sur la partie droite, nous trouvons des valeurs de ndb supérieures à 5, ce qui semble être aberrant.

Tout comme nous avons fait avec la séquence PRESS dans la première partie de ce chapitre, nous pouvons à présent réfléchir à une stratégie d'acquisition pour la détection des omégas-3.

#### **4.3.4.4. Détection des omégas-3**

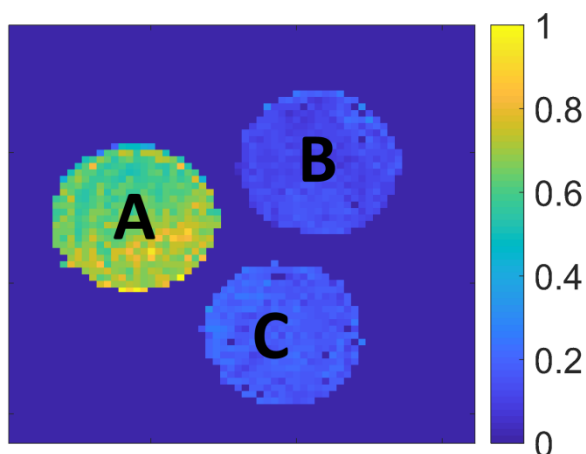
La détection du pic de méthyl des omégas-3 requière une bonne résolution spectrale pour distinguer le pic résonant à 0,97 ppm de celui à 0,90 ppm. La stratégie ici adoptée est de se positionner, avec la séquence EPSI-SE, à un TE long où la majorité des résonances sont atténuées, par exemple à 470 ms où seules les résonances à 5,3 ppm, 1,3 ppm, 0,97 ppm et 0,90 ppm sont encore présentes. Pour améliorer la résolution spectrale, nous avons ici réduit la bande passante de réception jusqu'à pouvoir distinguer les deux pics mais tout en gérant le repliement spectral inhérent à l'utilisation d'un  $\Delta TE$  supérieur à 1 ms. En effet, pour avoir une résolution spectrale suffisante, nous avons pris une BP à 3,90 ppm (résolution spectrale de 1,52 Hz/pts). Le groupement résonant à 5,3 ppm se retrouve alors replié sur nos spectres à 1,4 ppm (figure 4.30) avec une amplitude négative. Sur la figure 4.30, nous pouvons voir que pour chaque huile les deux groupements de méthyl sont bien définis. Des artéfacts sont cependant toujours présents dans la région autour de -1 ppm.



**Figure 4.30 :** Premier écho de la séquence EPSI-SE (TE = 470 ms, TR = 1,5 s, bande passante = 3,90 ppm, résolution spectral = 1,52 Hz/pts, résolution spatiale = 0,47 x 0,47 mm<sup>2</sup>, épaisseur de coupe = 5 mm, 8 accumulations, temps d’acquisition = 12 min 48 s) accompagné des spectres des trois huiles après transformée de Fourier. La proportion d’oméga-3 est de 34,37 %, 7,69 % et 4,60 % pour les huiles de lin, de noix et de colza respectivement.

Nous avons ici montré qu’il était possible de détecter les oméga-3 avec une séquence d’imagerie. Il est alors envisageable de faire une cartographie des oméga-3 après avoir recalé tous les spectres. Ici une détection du pic maximum pose problème car pour le lin le pic dominant est celui des oméga-3 alors que dans d’autres cas c’est celui des autres acides gras. Pour la suite de ce paragraphe, nous n’avons pas fait de détection automatique et avons traité le cas du lin à part.

Sur le même principe que précédemment, nous sommes les images qui correspondent à l’aire sous la courbe du pic à 0,97 ppm et à 0,90 ppm. La proportion d’oméga-3 est exprimé comme le  $A_{\text{pic}0,97}/(A_{\text{pic}0,97} + A_{\text{pic}0,90})$ . Il est alors possible de faire une cartographie des proportions d’oméga-3 (figure 4.31).



**Figure 4.31 : Proportion d'oméga-3 issue d'une séquence EPSI-SE (TE = 470 ms, TR = 1,5 s, bande passante = 3,90 ppm, résolution spectral = 1,52 Hz/pts, résolution spatiale = 0,47 x 0,47 mm<sup>2</sup>). En A est positionnée l'huile de lin, B) l'huile de colza et C) l'huile noix. La proportion d'oméga-3 mesurée (vs théorique) est de : 11,9 % (vs 4,6 %) pour l'huile de colza, 17,3 % (vs 7,69 %) pour l'huile de noix et 64,9 % (vs 34, 37%) pour l'huile de lin.**

En reprenant les valeurs des T2 estimés dans la première partie du chapitre à savoir 270 ms pour le pic à 0,90 ppm et 550 ms pour celui à 0,97 ppm. Nous retrouvons des valeurs proches de celles estimées précédemment à savoir : 11,9 % pour l'huile de colza, 17,3 % pour l'huile de noix et 64,9 % pour l'huile de lin. Il faut noter cependant que si nous prenons en compte seulement les 3 trois huiles (lin, noix et colza) pour estimer le T2 moyen du pic de 0,97 ppm, nous trouvons une valeur de 1140 ms. Le calcul des T2 de la composante à 0,97 ppm et à 0,90 ppm est complexe. Mais ici avec un T2 à 200 ms pour le pic à 0,90 ppm et à 1140 pour le pic à 0,97 ppm, les proportions d'oméga-3 trouvées sont plus proches de celle de chromatographie en phase gazeuse : 4,7 % pour l'huile de colza, 7,1 % pour l'huile de noix et 37,7 % pour l'huile de lin. Le calcul des T2 serait donc une nouvelle fois clé pour une estimation correcte des proportions d'oméga-3.

### Limitations

Dans cette analyse, nous n'avons utilisé que des huiles avec une forte concentration d'oméga-3 qui est supérieure aux concentrations attendues *in vivo* : 2,3% pour la souris (Li, Fu, et Li 2010). De plus, nous ne l'avons pas testé sur des émulsions pour lesquelles le pic d'eau poserait problème car sa résonance se retrouverait proche des résonances d'intérêts. Il faudrait alors adapter la bande passante de réception (BP) pour éviter ce chevauchement, par exemple, avec une BP à 6,6 ppm, le pic de 5,3 ppm serait à -1,3 ppm et l'eau à -1.9 ppm. Une autre possibilité serait d'utiliser un module de suppression d'eau. Toutefois, le facteur le plus limitant *in vivo* est la largeur à mi-hauteur des pics qui résulte du temps de relaxation T2\* (proportionnelle à  $1/\pi T2^*$ ). *In vitro*, l'homogénéité du champ local est bonne et permet d'avoir une largeur à mi-hauteur des pics de l'ordre de 12 Hz (T2\* long de l'ordre 30 ms). Or, *in vivo* le T2\* est généralement plus court (de l'ordre de 20 ms) élargissant les pics. Ceci rendrait donc difficile la distinction des groupements de méthyl. Enfin, un autre facteur

limitant pour l'utilisation de ce protocole *in vivo* serait le temps d'acquisition, pour une matrice de 128 x 128, une coupe et au minimum 8 accumulations, il faudrait compter ~ 26 min.

Toutefois, ce type d'imagerie utilisant des voxels plus petits permettrait d'assurer un champ local plus homogène que pour la spectroscopie localisée qui utilisait des voxels 100 fois plus grands.

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons pu voir qu'il était possible de détecter la présence d'oméga-3 et de les quantifier sur des huiles avec des séquences PRESS multiple TE. Cette quantification n'est pas parfaitement égale aux valeurs estimées par chromatographie en phase gazeuse, mais très bien corrélées ( $r = 0,996$ ,  $p < 0,001$ ). L'estimation des T2 est ici critique pour assurer une bonne estimation des proportions d'acide gras et d'oméga-3. L'estimation des paramètres *ndb* et *nmidb* en utilisant plusieurs TE inférieur à 140 ms est ici très proche des valeurs théoriques de chromatographie en phase gazeuse. Cependant, il est évident que le T2 estimé du méthyl est sous-estimé. Le groupement de méthyl se révèle être complexe à modéliser avec des effets de J-modulation sur l'amplitude ou d'une différence possible de T2 entre les différents types d'acide gras. Il est par conséquent plus sujet à des erreurs d'estimations, pourtant, il est largement utilisé dans la littérature pour normaliser les rapports d'insaturation et de polyinsaturation (Zancanaro et al. 1994; Corbin et al. 2009; Lundbom et al. 2010; Hamilton, Yokoo, et al. 2011; Machann et al. 2017). Ce chapitre montre aussi l'intérêt d'utiliser une séquence d'imagerie spectroscopique telle que l'EPSI dans le cadre d'étude préclinique. A notre connaissance, nous n'avons pas répertorié d'autres travaux sur la quantification des oméga-3 à partir d'une séquence d'imagerie spectroscopique que ceux présentés dans ce chapitre.



# Conclusion générale

Motivée par le besoin grandissant de nouveaux biomarqueurs pour évaluer le métabolisme lipidique, la problématique de cette thèse a été l'étude de la quantification lipidique par SRM et IRM *in vivo*. Nous avons vu au cours de ce manuscrit que la quantification lipidique pouvait prendre plusieurs formes. Nous pouvons étudier les différents dépôts des tissus adipeux - lieu dédié pour le stockage des graisses - ou encore le foie - accumulation ectopique de la graisse. Plusieurs paramètres ont alors émergé : le volume, la fraction de graisse et la composition lipidique. Au cours des travaux de cette thèse nous avons donc dû faire face à des problématiques liées à l'estimation paramétrique et se poser les questions suivantes : est-ce que nous mesurons avec précision ce que nous souhaitons mesurer ? Est-ce que nos mesures sont répétables ? Est-ce qu'à partir de ces paramètres, nous pouvons analyser des modifications qui seraient liées aux changements métaboliques ? Dans le cadre d'une étude longitudinale, où il est recherché l'observation fiable des évolutions des données acquises d'un instant t1 à un instant t2, il était nécessaire de réduire au maximum la variabilité de l'estimation des paramètres.

Pour le traitement du signal de spectroscopie, des études comme celle de Mosconi et al. (Mosconi et al. 2014) ont montré que l'estimation finale de la composition lipidique pouvait varier de façon importante selon la méthode utilisée (AMARES, LCMoDel, QUEST ...). Cependant, ces études ne s'étaient pas interrogées sur l'impact de la fonction modèle utilisée ou encore de son implémentation. Notamment, dans le cas de l'étude du spectre RMN des lipides, il est vite possible d'être confronté à un problème mal posé. Nous avons montré dans le chapitre 2 que l'utilisation de modèle de plus en plus complexe pour l'estimation paramétrique de la composition lipidique n'était pas la meilleure solution. Cette pratique est pourtant utilisée dans plusieurs articles (Hamilton et al. 2017), avec par exemple plusieurs pics de résonance utilisés pour décrire la résonance du méthylène. Dans le cas des lipides, la fonction modèle peut être adaptée à l'objet étudié comme ici les chaînes de triglycérides. Ainsi, l'utilisation d'une fonction modèle simplifiée avec une implémentation spécifique qui permet de réduire le nombre de paramètres à estimer apparaît, d'après nos résultats, être une solution pertinente pour l'étude des spectres *in vivo*. Cette méthode peut pourtant apparaître contre-intuitive et déstabilisante pour la communauté orientée « spectroscopie RMN », car la méthode ne s'emploie pas à modéliser parfaitement le signal acquis mais plutôt à trouver de façon robuste les paramètres d'intérêt. Les estimations les plus communément réalisées

jusqu'ici étaient basées sur le calcul des amplitudes des différentes résonances lipidiques, puis des rapports de ces amplitudes étaient faits afin d'avoir la composition lipidique. Plusieurs rapports d'amplitudes ont été proposés ces dernières années sans consensus en la matière (Zancanaro et al. 1994; Ren et al. 2008; Corbin et al. 2009). Ces différentes définitions pouvant notamment conduire à des résultats différents comme montré dans la thèse d'Amandine Coum (Université de Rennes 1, 2015). Fondés sur des travaux réalisés sur des spectres en haute résolution (HR-MAS), Hamilton, Yokoo, et al. (2011) ont décrit le signal lipidique à partir de nouveaux paramètres liés à la structure de la chaîne de triglycéride tels que le nombre moyen de double liaison par triglycéride (ndb), le nombre moyen de méthylène interrompant des doubles liaisons (nmidb) et la longueur de chaîne moyenne (CL). L'imagerie quantitative s'est alors basée sur ces paramètres pour définir un modèle simplifié applicable à l'IRM (Bydder, Girard, et Hamilton 2011; Peterson et Månsson 2013; Benjamin Leporq et al. 2014). Dans ce manuscrit, nous avons donc montré que l'utilisation d'un modèle similaire constituait une solution valable avec de faibles variabilités des résultats et suffisamment de sensibilité pour refléter correctement la composition lipidique - mais avec comme contrepartie- un possible biais de mesure qui dépend des *a priori* utilisés.

Par la suite, à partir de l'étude du tissu adipeux, nous avons montré que la technique d'imagerie quantitative utilisée dans cette thèse permet d'avoir accès à plusieurs paramètres quantitatifs. La séquence basée sur une séquence multi-écho de gradient (Benjamin Leporq et al. 2014) a l'avantage d'être disponible sur la majorité des imageurs cliniques. L'acquisition en 3D des tissus permet de les segmenter pour en déduire le volume. Le sous-échantillonnage temporel fondé sur l'écart de phase entre la résonance de l'eau et la résonance principale de la graisse associé à un traitement post-acquisition adapté permet, dans un premier temps, d'estimer la proportion de graisse par rapport à l'eau et dans un second temps d'évaluer la composition lipidique. Les résultats d'IRM étaient, à notre connaissance, pour la première fois comparés aux mesures de chromatographie en phase gazeuse chez l'humain. Ici nous avons principalement étudié le tissu adipeux, cependant cette technique peut être aussi appliquée sur d'autres organes comme le foie pour l'étude des stéatoses non-alcoolique (Leporq et al. 2016), sur les graisses de la moelle osseuse pour voir, par exemple, une éventuelle modification lipidique au moment de la ménopause (Martel et al. 2018). S'il avait déjà été démontré que l'IRM permettait de mesurer les volumes des tissus adipeux lors de régimes alimentaires spécifiques (Erlingsson et al. 2009) et de mesurer le contenu en graisse dans des dépôts ectopiques comme le foie, le pancréas et les muscles, la valeur ajoutée de

cette thèse est qu'il est aussi possible à présent d'avoir des paramètres quantitatifs liés à la composition des chaînes triglycérides (*ndb* et *nmidb*).

Dans le chapitre 4, nous avons décrit une méthode SRM et ISRM pour quantifier les oméga-3. A notre connaissance, nous sommes les seuls à avoir utilisé une séquence EPSI pour la détection et la quantification d'oméga-3. Les résultats dans ce chapitre sont suffisamment encourageants pour pouvoir envisager des tests *in vivo* chez la souris. L'implémentation de la séquence EPSI permet d'obtenir des espacements entre échos plus petit qu'en multi-écho de gradient. Cette séquence est alors une bonne alternative pour adapter les méthodes développées dans le chapitre 3 à plus haut champs magnétique. Enfin le chapitre 4 montre que le spectre fréquentiel a encore un intérêt. Notamment, il pourrait aussi être envisagé d'utiliser l'imagerie spectroscopique EPSI pour l'étude du contenu lipidique des muscles (déjà réalisée en PRESS MRSI (X. Li et al. 2008)). En effet, il existe une différence fréquentielle subtile entre les lipides intra-myocyte et extra myocyte, dans ce cas-là un spectre « résolu » est nécessaire pour pouvoir les distinguer. Actuellement, seule la SRM permet de différencier ce contenu lipidique. L'imagerie spectroscopique présente cependant des contraintes liées au temps d'acquisition. Des stratégies de sous-échantillonnage pourraient alors être une solution (Lam et al. 2016; Karkouri et al. 2017).

A l'issue de cette thèse, nous pouvons entrevoir plusieurs perspectives et axes de recherche pour la quantification lipidique. Dans le chapitre 2, nous avons montré que l'utilisation d'un modèle simplifié fondé sur la structure d'une chaîne de triglycéride était une solution valable. Cependant, cette méthode est limitée par l'utilisation d'une relation entre *ndb* et *nmidb* qui contraint les résultats à des solutions reflétant au mieux les valeurs *in vivo* du tissu adipeux. Cette relation est empirique (Bydder, Girard, et Hamilton 2011) et peut être remise en cause, ne fonctionnant pas pour déterminer la composition lipidique des huiles par exemple. Une méthode prometteuse pour la création d'un modèle prédictif (sans contrainte empirique) serait l'utilisation de l'apprentissage automatique sur les spectres. Cette méthode fait actuellement l'objet de recherche au sein du laboratoire CREATIS avec une application sur le spectre cérébral (Hatami, Sdika, et Ratiney 2018). Cependant, l'utilisation d'une telle méthode nécessite la mise en place d'une base d'apprentissage et d'une base de test avec des spectres calibrés qui soit suffisamment diversifiés pour que le modèle prédictif soit robuste. Dans le chapitre 3, nous avons montré que l'IRM (CSE-MRI) permettait de remonter à la composition lipidique et que cette dernière était corrélée aux résultats de chromatographie en phase gazeuse. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que la mesure moyenne est

réalisée sur tout le volume étudié minimisant l'effet des valeurs aberrantes. A l'heure actuelle, tout le traitement post-acquisition se fait en dehors de la console de l'IRM et n'est pas applicable en temps réel (plusieurs heures de traitement pour un traiter un volume 3D d'images). A ce titre, pour l'étude localisée, le spectre SRM peut permettre une inspection visuelle simple et rapide des différentes résonances qui doit cependant être réalisée par un spécialiste. La séquence CSE-MRI utilisée ici est faite en apnée (~20s), ce qui peut être aussi une limite. Avec une limitation de temps d'acquisition moins restrictive, la résolution spatiale pourrait être améliorée et permettrait la distinction entre tissu adipeux sous-cutané superficiel et profond. Une solution pourrait être l'utilisation d'un encodage radial comme présenté dans de récent travaux (Armstrong et al. 2018) qui permet de faire une acquisition en respiration libre mais qui demande alors des corrections du mouvement. La combinaison d'encodage radial et de la calibration adaptative des gradients sont des perspectives d'intérêt (Schneider et al. 2018).

# Publications et communications

## Articles dans des revues à comité de lecture

**A. Nemeth, L. Di Marco, F. Boutitie, M. Sdika, D. Grenier, M. Rabilloud, O. Beuf, J. B. Pialat.** Reproducibility of in vivo Magnetic Resonance Imaging T1rho and T2 relaxation time measurements of hip cartilage at 3.0T in healthy volunteers. *J. Magn. Reson. Imaging* 2018;47(4):1022-1033.

**A. Nemeth, B. Segrestin, B. Leporq, A. Coum, G. Gambarota, K. Seyssel, M. Laville, O. Beuf, H. Ratiney.** Comparison of MRI-derived vs. traditional estimations of fatty acid composition from MR spectroscopy signals. *NMR in Biomedicine*, 2018;31(9):e3991.

**A. Nemeth, B. Segrestin, B. Leporq, K. Seyssel, K. Faraz, V. Sauvinet, E. Disse, P. J. Valette, M. Laville, H. Ratiney, O. Beuf.** 3D chemical shift-encoded MRI for volume and composition quantification of abdominal adipose tissue during an overfeeding protocol in healthy volunteers, *J. Magn. Reson. Imaging*, (in press).

## Communications dans des congrès internationaux avec comité de lecture

**A. Nemeth, L. Di Marco, M. Sdika, D. Grenier, O. Beuf, J. B. Pialat.** Repeatability and reproducibility of in vivo magnetic resonance T1rho relaxation time measurements of hip cartilage at 3T, à l'ISMRM, Singapore, mai 2016. (*poster*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, B. Segrestin, K. Seyssel, H. Vidal, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Detection of adipose tissue fatty acid composition changes with 3.0T MRI in a 1 month overfeeding protocol, à l'ESMRMB, Vienna, Austria, septembre 2016. (*présentation orale*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Quantification of abdominal subcutaneous and visceral fat by magnetic resonance imaging of the proton at 3T: application to an overfeeding protocol, à l'ISMRM, Honolulu, Hawaï, États-Unis, avril 2017. (*poster*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, A. Coum, G. Gambarota, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Impact of time sample selection and model function design on the quantification of fatty acid composition: in vitro and in vivo studies, à l'ISMRM, Honolulu, Hawaï, États-Unis, avril 2017. (*poster*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Effect of the phase variation induced by eddy currents on localized spectroscopy fatty acid composition quantification and its correction, à l'ISMRM-ESMRMB, Paris, France, juin 2018. (*poster*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Effect of polyphenols during a high-fat diet enhanced with chemical shift-encoded MRI, à l'ISMRM-ESMRMB, Paris, France, juin 2018. (*poster*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Comparison of 3D spoiled-gradient multiple echo with STEAM for proton density fat fraction and fatty acid composition estimation, à l'ISMRM-ESMRMB, Paris, France, juin 2018. (*présentation orale*)

## **Communications dans des congrès nationaux avec comité de lecture**

**L. Di Marco, A. Nemeth, M. Sdika, F. Boutitie, D. Grenier, M. Rabilloud, O. Beuf, J.-B. Pialat.** Evaluation des mesures des temps de relaxation  $T1\rho$  et  $T2$  du cartilage de hanche en IRM à 3 T chez des volontaires sains, Journées francophones de Radiologie, Paris, octobre 2016. (*présentation orale*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, B. Segrestin, K. Seyssel, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Analyses quantitatives et qualitatives des adiposités abdominales avec une séquence multi-écho de gradient à 3T appliquées à un protocole de surnutrition, in SFRMBM, Bordeaux, France, mars 2017. (*présentation orale*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, A. Coum, G. Gambarota, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Etude de modèles paramétriques pour l'estimation de la composition lipidique en spectroscopie de résonance magnétique : comparaison théorique des fonctions modèles et application in vivo, SFRMBM, Bordeaux, France, mars 2017. (*présentation orale*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Quantification des graisses abdominales sous-cutanées et viscérales par résonance magnétique nucléaire du proton à 3T : application à un protocole de surnutrition, in RITS, Lyon, France, mars 2017. (*présentation orale*)

**A. Nemeth, H. Ratiney, B. Leporq, A. Coum, G. Gambarota, K. Seyssel, B. Segrestin, P. J. Valette, M. Laville, O. Beuf.** Modèle paramétrique pour l'estimation de la composition lipidique en spectroscopie de résonance magnétique, in RITS, Lyon, France, mars 2017. (*poster*)

# Références

- Acheson, K. J., Y. Schutz, T. Bessard, K. Anantharaman, J. P. Flatt, and E. Jéquier. 1988. “Glycogen Storage Capacity and de Novo Lipogenesis during Massive Carbohydrate Overfeeding in Man.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 48 (2): 240–47. <https://doi.org/10.1093/ajcn/48.2.240>.
- Achmad, Emil, Takeshi Yokoo, Gavin Hamilton, Elhamy Heba, Jonathan C. Hooker, Christopher Changchien, Michael Schroeder, et al. 2015. “Feasibility of and Agreement between MR Imaging and Spectroscopic Estimation of Hepatic Proton Density Fat Fraction in Children with Known or Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Abdominal Imaging* 40 (8): 3084–90. <https://doi.org/10.1007/s00261-015-0506-9>.
- Ahmadi, Naser, Fereshteh Hajsadeghi, Mark Conneely, Mark Mingos, Rohit Arora, Matthew Budoff, and Ramin Ebrahimi. 2013. “Accurate Detection of Metabolically Active ‘Brown’ and ‘White’ Adipose Tissues with Computed Tomography.” *Academic Radiology* 20 (11): 1443–47. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2013.08.012>.
- Akoka, Serge, Laurent Barantin, and Michel Trierweiler. 1999. “Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method.” *Analytical Chemistry* 71 (13): 2554–57. <https://doi.org/10.1021/ac981422i>.
- Alligier, Maud, Laure Gabert, Emmanuelle Meugnier, Stéphanie Lambert-Porcheron, Emilie Chanseau, Frank Pilleul, Cyrille Debard, et al. 2013. “Visceral Fat Accumulation During Lipid Overfeeding Is Related to Subcutaneous Adipose Tissue Characteristics in Healthy Men.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (2): 802–10. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3289>.
- Alligier, Maud, Kevin Seyssel, Emmanuel Disse, and Martine Laville. 2013. “LE TISSU ADIPEUX : COULEUR, LOCALISATION, FONCTIONS ET AUTRES DONNÉES NOUVELLES.” In . Paris: LES ÉDITIONS DE MÉDECINE PRATIQUE.
- Anhê, Fernando F., Yves Desjardins, Geneviève Pilon, Stéphanie Dudonné, Maria Inés Genovese, Franco M. Lajolo, and André Marette. 2013. “Polyphenols and Type 2 Diabetes: A Prospective Review.” *PharmaNutrition, Designing tomorrow’s health ingredients*, 1 (4): 105–14. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.07.004>.
- Anhê, Fernando F., Thibault V. Varin, Mélanie Le Barz, Yves Desjardins, Emile Levy, Denis Roy, and André Marette. 2015. “Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts.” *Current Obesity Reports* 4 (4): 389–400. <https://doi.org/10.1007/s13679-015-0172-9>.
- Argo, Curtis K., James T. Patrie, Carolin Lackner, Thomas D. Henry, Eduard E. de Lange, Arthur L. Weltman, Neeral L. Shah, et al. 2015. “Effects of N-3 Fish Oil on Metabolic and Histological Parameters in NASH: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial.” *Journal of Hepatology* 62 (1): 190–97. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.036>.
- Armstrong, Tess, Isabel Dregely, Alto Stemmer, Fei Han, Yutaka Natsuaki, Kyunghyun Sung, and Holden H. Wu. 2018. “Free-Breathing Liver Fat Quantification Using a Multiecho 3D Stack-of-Radial Technique.” *Magnetic Resonance in Medicine* 79 (1): 370–82. <https://doi.org/10.1002/mrm.26693>.
- Bahadoran, Zahra, Parvin Mirmiran, and Fereidoun Azizi. 2013. “Dietary Polyphenols as Potential Nutraceuticals in Management of Diabetes: A Review.” *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 12 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-43>.
- Balkau, B., and M. A. Charles. 1999. “Comment on the Provisional Report from the WHO Consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR).” *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 16 (5): 442–43.

- Behar, Kevin L., and Takashi Ogino. 1991. "Assignment of Resonances in the <sup>1</sup>H Spectrum of Rat Brain by Two-Dimensional Shift Correlated and j-Resolved NMR Spectroscopy." *Magnetic Resonance in Medicine* 17 (2): 285–303. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910170202>.
- Bjørndal, Bodil, Lena Burri, Vidar Staalesen, Jon Skorve, and Rolf K. Berge. 2011. "Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents." *Journal of Obesity* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/490650>.
- Boesch, Chris, Juergen Machann, Peter Vermathen, and Fritz Schick. 2006. "Role of Proton MR for the Study of Muscle Lipid Metabolism." *NMR in Biomedicine* 19 (7): 968–88. <https://doi.org/10.1002/nbm.1096>.
- Bottomley, Paul A. 1987. "Spatial Localization in NMR Spectroscopy in Vivo." *Annals of the New York Academy of Sciences* 508 (1): 333–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb32915.x>.
- Bottomley, Paul A., and John R. Griffiths. 2016. *Handbook of Magnetic Resonance Spectroscopy In Vivo: MRS Theory, Practice and Applications*. John Wiley & Sons.
- Brix, Gunnar, Sabine Heiland, Matthias E. Belleman, Thomas Koch, and Walter J. Lorenz. 1993. "MR Imaging of Fat-Containing Tissues: Valuation of Two Quantitative Imaging Techniques in Comparison with Localized Proton Spectroscopy." *Magnetic Resonance Imaging* 11 (7): 977–91. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(93\)90217-2](https://doi.org/10.1016/0730-725X(93)90217-2).
- Bydder, Mark, Olivier Girard, and Gavin Hamilton. 2011. "Mapping the Double Bonds in Triglycerides." *Magnetic Resonance Imaging* 29 (8): 1041–46. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2011.07.004>.
- Chowdhury, B., L. Sjöström, M. Alpsten, J. Kostanty, H. Kvist, and R. Löfgren. 1994. "A Multicompartment Body Composition Technique Based on Computerized Tomography." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity* 18 (4): 219–34.
- Chuang, Yi-Chou, Kuang-Hung Hsu, Chorng-Jer Hwang, Pai-Min Hu, Tzu-Miao Lin, and Wen-Ko Chiou. 2006. "Waist-to-Thigh Ratio Can Also Be a Better Indicator Associated with Type 2 Diabetes Than Traditional Anthropometrical Measurements in Taiwan Population." *Annals of Epidemiology* 16 (5): 321–31. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.04.014>.
- Corbin, Ian R., Emma E. Furth, Stephen Pickup, Evan S. Siegelman, and Edward J. Delikatny. 2009. "In Vivo Assessment of Hepatic Triglycerides in Murine Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using Magnetic Resonance Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (8): 757–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.014>.
- Coum, Amandine. 2015. "Développement de Méthodes de SRM à 4,7 T Pour l'étude in Vivo Du Métabolisme Lipidique Chez La Souris."
- Coum, Amandine, Fanny Noury, Elise Bannier, Karima Begriche, Bernard Fromenty, Yves Gandon, Hervé Saint-Jalmes, and Giulio Gambarota. 2016. "The Effect of Water Suppression on the Hepatic Lipid Quantification, as Assessed by the LCMoDel, in a Preclinical and Clinical Scenario." *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 29 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1007/s10334-015-0508-1>.
- Coum, Amandine, Lobna Ouldamer, Fanny Noury, Laurent Barantin, Aymeric Saint-Hilaire, Anne Vilde, Philippe Bougnoux, and Giulio Gambarota. 2016. "In Vivo MR Spectroscopy of Human Breast Tissue: Quantification of Fatty Acid Composition at a Clinical Field Strength (3 T)." *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 29 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1007/s10334-015-0506-3>.



- Després, J. P. 2006. "Intra-Abdominal Obesity: An Untreated Risk Factor for Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease." *Journal of Endocrinological Investigation* 29 (3 Suppl): 77–82.
- Dixon, W T. 1984. "Simple Proton Spectroscopic Imaging." *Radiology* 153 (1): 189–94. <https://doi.org/10.1148/radiology.153.1.6089263>.
- Dorez, Hugo, Hélène Ratiney, Laurence Canaple, Hervé Saint-Jalmes, Sophie Gaillard, Driffa Moussata, Raphaël Sablong, and Olivier Beuf. 2017. "In Vivo MRS for the Assessment of Mouse Colon Using a Dedicated Endorectal Coil: Initial Findings." *NMR in Biomedicine* 30: e3794. <https://doi.org/10.1002/nbm.3794>.
- Dreher, Wolfgang, and Dieter Leibfritz. 1995. "On the Use of Two-Dimensional-J NMR Measurements for in Vivo Proton MRS: Measurement of Homonuclear Decoupled Spectra without the Need for Short Echo Times." *Magnetic Resonance in Medicine* 34 (3): 331–37. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910340309>.
- Erlingsson, Styrbjörn, Sebastian Herard, Olof Dahlqvist Leinhard, Torbjörb Lindström, Toste Länne, Magnus Borga, and Fredrik H. Nystrom. 2009. "Men Develop More Intraabdominal Obesity and Signs of the Metabolic Syndrome after Hyperalimentation than Women." *Metabolism* 58 (7): 995–1001. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.02.028>.
- Fallone, Clara J., Ryan T. McKay, and Atiyah Yahya. 2018. "Long TE STEAM and PRESS for Estimating Fat Olefinic/Methyl Ratios and Relative  $\omega$ -3 Fat Content at 3T." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 48 (1): 169–77. <https://doi.org/10.1002/jmri.25920>.
- Field, C. J., A. Angel, and M. T. Clandinin. 1985. "Relationship of Diet to the Fatty Acid Composition of Human Adipose Tissue Structural and Stored Lipids." *The American Journal of Clinical Nutrition* 42 (6): 1206–20.
- Fogelholm, M., and W. van Marken Lichtenbelt. 1997. "Comparison of Body Composition Methods: A Literature Analysis." *European Journal of Clinical Nutrition* 51 (8): 495–503. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600448>.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues." *The Journal of Biological Chemistry* 226 (1): 497–509.
- Frahm, Jens, Klaus-Dietmar Merboldt, and Wolfgang Hänicke. 1987. "Localized Proton Spectroscopy Using Stimulated Echoes." *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 72 (3): 502–8. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(87\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0022-2364(87)90154-5).
- Gabert, Laure, Cécile Vors, Corinne Louche-Pélissier, Valérie Sauvinet, Stéphanie Lambert-Porcheron, Jocelyne Draï, Martine Laville, Michel Désage, and Marie-Caroline Michalski. 2011. "<sup>13</sup>C Tracer Recovery in Human Stools after Digestion of a Fat-Rich Meal Labelled with [1,1,1-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]Tripalmitin and [1,1,1-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]Triolein." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25 (19): 2697–2703. <https://doi.org/10.1002/rcm.5067>.
- Gajdošík, Martin, Grzegorz L. Chadzynski, Gilbert Hangel, Vladimír Mlynárik, Marek Chmelík, Ladislav Valkovič, Wolfgang Bogner, et al. 2015. "Ultrashort-TE Stimulated Echo Acquisition Mode (STEAM) Improves the Quantification of Lipids and Fatty Acid Chain Unsaturation in the Human Liver at 7 T." *NMR in Biomedicine* 28 (10): 1283–93. <https://doi.org/10.1002/nbm.3382>.
- Garaulet, M., J. J. Hernandez-Morante, J. Lujan, F. J. Tebar, and S. Zamora. 2006. "Relationship between Fat Cell Size and Number and Fatty Acid Composition in Adipose Tissue from Different Fat Depots in Overweight/Obese Humans." *International Journal of Obesity* 30 (6): 899–905. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803219>.

- Hakumäki, Juhana M., and Risto A. Kauppinen. 2000. "1H NMR Visible Lipids in the Life and Death of Cells." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (8): 357–62. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01614-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01614-5).
- Hamilton, Gavin, Michael S. Middleton, Mark Bydder, Takeshi Yokoo, Jeffrey B. Schwimmer, Yuko Kono, Heather M. Patton, Joel E. Lavine, and Claude B. Sirlin. 2009. "Effect of PRESS and STEAM Sequences on Magnetic Resonance Spectroscopic Liver Fat Quantification." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 30 (1): 145–52. <https://doi.org/10.1002/jmri.21809>.
- Hamilton, Gavin, Alexandra N. Schlein, Michael S. Middleton, Catherine A. Hooker, Tanya Wolfson, Anthony C. Gamst, Rohit Loomba, and Claude B. Sirlin. 2017. "In Vivo Triglyceride Composition of Abdominal Adipose Tissue Measured by 1H MRS at 3T." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 45 (5): 1455–63. <https://doi.org/10.1002/jmri.25453>.
- Hamilton, Gavin, Daniel L. Smith, Mark Bydder, Krishna S. Nayak, and Houchun H. Hu. 2011. "MR Properties of Brown and White Adipose Tissues." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 34 (2): 468–73. <https://doi.org/10.1002/jmri.22623>.
- Hamilton, Gavin, Takeshi Yokoo, Mark Bydder, Irene Cruite, Michael E. Schroeder, Claude B. Sirlin, and Michael S. Middleton. 2011. "In Vivo Characterization of the Liver Fat 1H MR Spectrum." *NMR in Biomedicine* 24 (7): 784–90. <https://doi.org/10.1002/nbm.1622>.
- Hanhineva, Kati, Riitta Törrönen, Isabel Bondia-Pons, Jenna Pekkinen, Marjukka Kolehmainen, Hannu Mykkänen, and Kaisa Poutanen. 2010. "Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism." *International Journal of Molecular Sciences* 11 (4): 1365–1402. <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>.
- Hatami, Nima, Michaël Sdika, and Hélène Ratiney. 2018. "Magnetic Resonance Spectroscopy Quantification Using Deep Learning," June. <https://arxiv.org/abs/1806.07237>.
- Heymsfield, Steven B., and Thomas A. Wadden. 2017. "Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity." *New England Journal of Medicine* 376 (3): 254–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009>.
- Hodson, Leanne, C. Murray Skeaff, and Barbara A. Fielding. 2008. "Fatty Acid Composition of Adipose Tissue and Blood in Humans and Its Use as a Biomarker of Dietary Intake." *Progress in Lipid Research* 47 (5): 348–80. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.03.003>.
- Hooper, Lee, Rachel L. Thompson, Roger A. Harrison, Carolyn D. Summerbell, Andy R. Ness, Helen J. Moore, Helen V. Worthington, et al. 2006. "Risks and Benefits of Omega 3 Fats for Mortality, Cardiovascular Disease, and Cancer: Systematic Review." *BMJ* 332 (7544): 752–60. <https://doi.org/10.1136/bmj.38755.366331.2F>.
- Hu, H. H., and H. E. Kan. 2013. "Quantitative Proton MR Techniques for Measuring Fat." *NMR in Biomedicine* 26 (12): 1609–29. <https://doi.org/10.1002/nbm.3025>.
- Hu, Houchun H., Catherine D. G. Hines, Daniel L. Smith, and Scott B. Reeder. 2012. "Variations in T2\* and Fat Content of Murine Brown and White Adipose Tissues by Chemical-Shift MRI." *Magnetic Resonance Imaging* 30 (3): 323–29. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2011.12.004>.
- Hu, Houchun Harry, Jun Chen, and Wei Shen. 2016. "Segmentation and Quantification of Adipose Tissue by Magnetic Resonance Imaging." *Magma (New York, N.Y.)* 29 (2): 259–76. <https://doi.org/10.1007/s10334-015-0498-z>.
- Jakobsson, Andreas, Rolf Westerberg, and Anders Jacobsson. 2006. "Fatty Acid Elongases in Mammals: Their Regulation and Roles in Metabolism." *Progress in Lipid Research* 45 (3): 237–49. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>.

- Jové, Mariona, José María Moreno-Navarrete, Reinald Pamplona, Wifredo Ricart, Manuel Portero-Otín, and José Manuel Fernández-Real. 2013. "Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Exhibit Specific Lipidomic Signatures." *The FASEB Journal* 28 (3): 1071–81. <https://doi.org/10.1096/fj.13-234419>.
- Karampinos, Dimitrios C., Stefan Ruschke, Olga Gordijenko, Eduardo Grande Garcia, Hendrik Kooijman, Rainer Burgkart, Ernst J. Rummeny, Jan S. Bauer, and Thomas Baum. 2015. "Association of MRS-Based Vertebral Bone Marrow Fat Fraction with Bone Strength in a Human In Vitro Model." Research article. *Journal of Osteoporosis*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/152349>.
- Karkouri, Jabrane, Fabien Millioz, Magalie Viallon, Rémy Prost, and Hélène Ratiney. 2017. "Time Samples Selection in Spiral Acquisition for Sparse Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging." In *ICIP 2017*. <https://www2.securecms.com/ICIP2017/Papers/ViewPapers.asp?PaperNum=2064>.
- Kershaw, Erin E., and Jeffrey S. Flier. 2004. "Adipose Tissue as an Endocrine Organ." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (6): 2548–56. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>.
- Kwon, Hyuktae, Donghee Kim, and Joo Sung Kim. 2017. "Body Fat Distribution and the Risk of Incident Metabolic Syndrome: A Longitudinal Cohort Study." *Scientific Reports* 7 (September). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09723-y>.
- Lam, Fan, Chao Ma, Bryan Clifford, Curtis L. Johnson, and Zhi-Pei Liang. 2016. "High-Resolution 1H-MRSI of the Brain Using SPICE: Data Acquisition and Image Reconstruction." *Magnetic Resonance in Medicine* 76 (4): 1059–70. <https://doi.org/10.1002/mrm.26019>.
- Lankton, S., and A. Tannenbaum. 2008. "Localizing Region-Based Active Contours." *IEEE Transactions on Image Processing* 17 (11): 2029–39. <https://doi.org/10.1109/TIP.2008.2004611>.
- Large, V, O Peroni, D Letexier, H Ray, and M Beylot. 2004. "Metabolism of Lipids in Human White Adipocyte." *Diabetes & Metabolism* 30 (4): 294–309. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70121-0](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70121-0).
- Lee, Jane J., Alison Pedley, Udo Hoffmann, Joseph M. Massaro, Daniel Levy, and Michelle T. Long. 2018. "Visceral and Intrahepatic Fat Are Associated with Cardiometabolic Risk Factors Above Other Ectopic Fat Depots: The Framingham Heart Study." *The American Journal of Medicine* 131 (6): 684–692.e12. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.02.002>.
- Leporq, B., SA Lambert, M. Ronot, V. Vilgrain, and BE. Van Beers. 2017. "Simultaneous MR Quantification of Hepatic Fat Content, Fatty Acid Composition, Transverse Relaxation Time and Magnetic Susceptibility for the Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis." *NMR in Biomedicine* 30 (10): e3766. <https://doi.org/10.1002/nbm.3766>.
- Leporq, Benjamin, Lambert Simon A., Ronot Maxime, Boucenna Imane, Colinart Pierre, Cauchy Francois, Vilgrain Valerie, Paradis Valerie, and Van Beers Bernard E. 2016. "Hepatic Fat Fraction and Visceral Adipose Tissue Fatty Acid Composition in Mice: Quantification with 7.0T MRI." *Magnetic Resonance in Medicine* 76 (2): 510–18. <https://doi.org/10.1002/mrm.25895>.
- Leporq, Benjamin, Simon A. Lambert, Maxime Ronot, Valerie Vilgrain, and Bernard E. Van Beers. 2014. "Quantification of the Triglyceride Fatty Acid Composition with 3.0 T MRI." *NMR in Biomedicine* 27 (10): 1211–21. <https://doi.org/10.1002/nbm.3175>.
- Leporq, Benjamin, Hélène Ratiney, Frank Pilleul, and Olivier Beuf. 2013. "Liver Fat Volume Fraction Quantification with Fat and Water T1 and T2\* Estimation and Accounting for NMR Multiple Components in Patients with Chronic Liver Disease at 1.5 and 3.0 T." *European Radiology* 23 (8): 2175–86. <https://doi.org/10.1007/s00330-013-2826-x>.

- Li, Mengting, Weisi Fu, and Xiang-An Li. 2010. "Differential Fatty Acid Profile in Adipose and Non-Adipose Tissues in Obese Mice." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 3 (4): 303–7.
- Li, Xiaojuan, Jack F. Youngren, Ben Hyun, Giorgos K. Sakkas, Kathleen Mulligan, Sharmila Majumdar, Umesh B. Masharani, Morris Schambelan, and Ira D. Goldfine. 2008. "Technical Evaluation of in Vivo Abdominal Fat and IMCL Quantification Using MRI and MRSI at 3 T." *Magnetic Resonance Imaging* 26 (2): 188–97. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2007.06.006>.
- Lindeboom, Lucas, and Robin A. de Graaf. 2018. "Measurement of Lipid Composition in Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue with <sup>1</sup>H-MRS Homonuclear Spectral Editing." *Magnetic Resonance in Medicine* 79 (2): 619–27. <https://doi.org/10.1002/mrm.26740>.
- Lunati, Ernesto, Pasquina Marzola, Elena Nicolato, Mauro Fedrigo, Marco Villa, and Andrea Sbarbati. 1999. "In Vivo Quantitative Lipidic Map of Brown Adipose Tissue by Chemical Shift Imaging at 4.7 Tesla." *Journal of Lipid Research* 40 (8): 1395–1400.
- Lundbom, Jesper, Antti Hakkarainen, Barbara Fielding, Sanni Söderlund, Jukka Westerbacka, Marja-Riitta Taskinen, and Nina Lundbom. 2010. "Characterizing Human Adipose Tissue Lipids by Long Echo Time <sup>1</sup>H-MRS in Vivo at 1.5 Tesla: Validation by Gas Chromatography." *NMR in Biomedicine* 23 (5): 466–72. <https://doi.org/10.1002/nbm.1483>.
- Lundbom, Jesper, Antti Hakkarainen, Sanni Söderlund, Jukka Westerbacka, Nina Lundbom, and Marja-Riitta Taskinen. 2011. "Long-TE <sup>1</sup>H MRS Suggests That Liver Fat Is More Saturated than Subcutaneous and Visceral Fat." *NMR in Biomedicine* 24 (3): 238–45. <https://doi.org/10.1002/nbm.1580>.
- Lundbom, Jesper, Sami Heikkinen, Barbara Fielding, Antti Hakkarainen, Marja-Riitta Taskinen, and Nina Lundbom. 2009. "PRESS Echo Time Behavior of Triglyceride Resonances at 1.5T: Detecting  $\omega$ -3 Fatty Acids in Adipose Tissue in Vivo." *Journal of Magnetic Resonance* 201 (1): 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.07.026>.
- Machann, Jürgen, Oliver P. Bachmann, Klaus Brechtel, Dominik B. Dahl, Beate Wietek, Bernhard Klumpp, Hans-U. Häring, Claus D. Claussen, Stephan Jacob, and Fritz Schick. 2003. "Lipid Content in the Musculature of the Lower Leg Assessed by Fat Selective MRI: Intra- and Interindividual Differences and Correlation with Anthropometric and Metabolic Data." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 17 (3): 350–57. <https://doi.org/10.1002/jmri.10255>.
- Machann, Jürgen, Norbert Stefan, Robert Wagner, Malte Bongers, Erwin Schleicher, Andreas Fritsche, Hans-Ulrich Häring, Konstantin Nikolaou, and Fritz Schick. 2017. "Intra- and Interindividual Variability of Fatty Acid Unsaturation in Six Different Human Adipose Tissue Compartments Assessed by <sup>1</sup>H-MRS in Vivo at 3 T." *NMR in Biomedicine* 30: e3744. <https://doi.org/10.1002/nbm.3744>.
- Machann, Jürgen, Claus Thamer, Birgit Schnoedt, Norbert Stefan, Hans-Ulrich Haring, Claus D. Claussen, Andreas Fritsche, and Fritz Schick. 2006. "Hepatic Lipid Accumulation in Healthy Subjects: A Comparative Study Using Spectral Fat-Selective MRI and Volume-Localized <sup>1</sup>H-MR Spectroscopy." *Magnetic Resonance in Medicine* 55 (4): 913–17. <https://doi.org/10.1002/mrm.20825>.
- Makrogiannis, Sokratis, Suraj Serai, Kenneth W. Fishbein, Catherine Schreiber, Luigi Ferrucci, and Richard G. Spencer. 2012. "Automated Quantification of Muscle and Fat in the Thigh from Water-, Fat-, and Nonsuppressed MR Images." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 35 (5): 1152–61. <https://doi.org/10.1002/jmri.22842>.
- Mansfield, P. 1984. "Spatial Mapping of the Chemical Shift in NMR." *Magnetic Resonance in Medicine* 1 (3): 370–86. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910010308>.

- Månsson, Sven, Pernilla Peterson, and Edvin Johansson. 2012. "Quantification of Low Fat Contents: A Comparison of MR Imaging and Spectroscopy Methods at 1.5 and 3 T." *Magnetic Resonance Imaging* 30 (10): 1461–67. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.04.023>.
- Marsman, Hendrik A, Michal Heger, Jaap J Kloek, Syert L Nienhuis, Jochem R van Werven, Aart J Nederveen, Fiebo JW ten Kate, Jaap Stoker, and Thomas M van Gulik. 2011. "Reversal of Hepatic Steatosis by Omega-3 Fatty Acids Measured Non-Invasively by 1H-Magnetic Resonance Spectroscopy in a Rat Model." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26 (2): 356–63. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06326.x>.
- Martel, Dimitri, Benjamin Leporq, Mary Bruno, Ravinder R. Regatte, Stephen Honig, and Gregory Chang. 2018. "Chemical Shift-Encoded MRI for Assessment of Bone Marrow Adipose Tissue Fat Composition: Pilot Study in Premenopausal versus Postmenopausal Women." *Magnetic Resonance Imaging* 53 (November): 148–55. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2018.07.001>.
- Matta, Joane, Marie Zins, Anne Laure Feral-Pierssens, Claire Carette, Anna Ozguler, Marcel Goldberg, and Sébastien Czernichow. 2016. "Prévalence du surpoids, de l'obésité et des facteurs de risque cardio-métaboliques dans la cohorte Constances." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, April, 7.
- Meer, Rutger W. van der, Sebastiaan Hammer, Johannes W. A. Smit, Marijke Frölich, Jeroen J. Bax, Michaela Diamant, Luuk J. Rijzewijk, Albert de Roos, Johannes A. Romijn, and Hildo J. Lamb. 2007. "Short-Term Caloric Restriction Induces Accumulation of Myocardial Triglycerides and Decreases Left Ventricular Diastolic Function in Healthy Subjects." *Diabetes* 56 (12): 2849–53. <https://doi.org/10.2337/db07-0768>.
- Merhej, Dany, Hélène Ratiney, Chaouki Diab, Mohamad Khalil, Michaël Sdika, and Rémy Prost. 2014. "Fast Multidimensional NMR Spectroscopy for Sparse Spectra." *NMR in Biomedicine* 27 (6): 640–55. <https://doi.org/10.1002/nbm.3100>.
- Mescher, M., H. Merkle, J. Kirsch, M. Garwood, and R. Gruetter. 1998. "Simultaneous in Vivo Spectral Editing and Water Suppression." *NMR in Biomedicine* 11 (6): 266–72.
- Mierisová, Šárka, and Mika Ala-Korpela. 2001. "MR Spectroscopy Quantitation: A Review of Frequency Domain Methods." *NMR in Biomedicine* 14 (4): 247–59. <https://doi.org/10.1002/nbm.697>.
- Minehira, Kaori, Vincent Bettschart, Hubert Vidal, Nathalie Vega, Véronique Di Vetta, Valentine Rey, Philippe Schneiter, and Luc Tappy. 2003. "Effect of Carbohydrate Overfeeding on Whole Body and Adipose Tissue Metabolism in Humans." *Obesity Research* 11 (9): 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.150>.
- Mosconi, E., D. M. Sima, M. I. Osorio Garcia, M. Fontanella, S. Fiorini, S. Van Huffel, and P. Marzola. 2014. "Different Quantification Algorithms May Lead to Different Results: A Comparison Using Proton MRS Lipid Signals." *NMR in Biomedicine* 27 (4): 431–43. <https://doi.org/10.1002/nbm.3079>.
- Musa-Veloso, Kathy, Carolina Venditti, Han Youl Lee, Maryse Darch, Seth Floyd, Spencer West, and Ryan Simon. 2018. "Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Intervention Studies on the Effectiveness of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Nutrition Reviews* 76 (8): 581–602. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy022>.
- Nemeth, Angéline, Bérénice Segrestin, Benjamin Leporq, Amandine Coum, Giulio Gambarota, Kevin Seyssel, Martine Laville, Olivier Beuf, and Hélène Ratiney. 2018. "Comparison of MRI-Derived vs. Traditional Estimations of Fatty Acid Composition from MR Spectroscopy Signals." *NMR in Biomedicine* 31 (9): e3991. <https://doi.org/10.1002/nbm.3991>.

- Osborne, Timothy F. 2000. "Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action." *Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32379–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000017200>.
- Osorio-Garcia, M. I., D. M. Sima, F. U. Nielsen, U. Himmelreich, and S. Van Huffel. 2011. "Quantification of Magnetic Resonance Spectroscopy Signals with Lineshape Estimation." *Journal of Chemometrics* 25 (4): 183–92. <https://doi.org/10.1002/cem.1353>.
- Pandey, Kanti Bhooshan, and Syed Ibrahim Rizvi. 2009. "Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease." Research article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.
- Pansini, Vittorio, Aurélien Monnet, Julia Salleron, Pierre Hardouin, Bernard Cortet, and Anne Cotten. 2014. "3 Tesla 1H MR Spectroscopy of Hip Bone Marrow in a Healthy Population, Assessment of Normal Fat Content Values and Influence of Age and Sex." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 39 (2): 369–76. <https://doi.org/10.1002/jmri.24176>.
- Peterson, Pernilla, and Sven Månsson. 2013. "Simultaneous Quantification of Fat Content and Fatty Acid Composition Using MR Imaging." *Magnetic Resonance in Medicine* 69 (3): 688–97. <https://doi.org/10.1002/mrm.24297>.
- Peterson, Pernilla, Jonas Svensson, and Sven Månsson. 2014. "Relaxation Effects in MRI-Based Quantification of Fat Content and Fatty Acid Composition." *Magnetic Resonance in Medicine* 72 (5): 1320–29. <https://doi.org/10.1002/mrm.25048>.
- Petrus, P., D. Edholm, F. Rosqvist, I. Dahlman, M. Sundbom, P. Arner, M. Rydén, and U. Risérus. 2017. "Depot-Specific Differences in Fatty Acid Composition and Distinct Associations with Lipogenic Gene Expression in Abdominal Adipose Tissue of Obese Women." *International Journal of Obesity* 41 (8): 1295–98. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.106>.
- Pietrobelli, A., C. Formica, Z. Wang, and S. B. Heymsfield. 1996. "Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Body Composition Model: Review of Physical Concepts." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 271 (6): E941–51. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.6.E941>.
- Pietrobelli, Angelo, Zimian Wang, Carmelo Formica, and Steven B. Heymsfield. 1998. "Dual-Energy X-Ray Absorptiometry: Fat Estimation Errors Due to Variation in Soft Tissue Hydration." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 274 (5): E808–16. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.274.5.E808>.
- Pouliot, Marie-Christine, Jean-Pierre Després, André Nadeau, Sital Moorjani, Denis Prud'Homme, Paul J. Lupien, Angelo Tremblay, and Claude Bouchard. 1992. "Visceral Obesity in Men: Associations With Glucose Tolerance, Plasma Insulin, and Lipoprotein Levels." *Diabetes* 41 (7): 826–34. <https://doi.org/10.2337/diab.41.7.826>.
- Pouillet, Jean-Baptiste, Diana M. Sima, Arjan W. Simonetti, Bart De Neuter, Leentje Vanhamme, Philippe Lemmerling, and Sabine Van Huffel. 2007. "An Automated Quantitation of Short Echo Time MRS Spectra in an Open Source Software Environment: AQSES." *NMR in Biomedicine* 20 (5): 493–504. <https://doi.org/10.1002/nbm.1112>.
- Provencher, Stephen W. 1993. "Estimation of Metabolite Concentrations from Localized in Vivo Proton NMR Spectra." *Magnetic Resonance in Medicine* 30 (6): 672–79. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910300604>.
- . 2001. "Automatic Quantitation of Localized in Vivo 1H Spectra with LCMoDel." *NMR in Biomedicine* 14 (4): 260–64. <https://doi.org/10.1002/nbm.698>.
- Qiao, Q., and R. Nyamdorj. 2010. "Is the Association of Type II Diabetes with Waist Circumference or Waist-to-Hip Ratio Stronger than That with Body Mass Index?"

- Ramamonjisoa, Nirilanto, Helene Ratiney, Elodie Mutel, Herve Guillou, Gilles Mithieux, Frank Pilleul, Fabienne Rajas, Olivier Beuf, and Sophie Cavassila. 2013. “In Vivo Hepatic Lipid Quantification Using MRS at 7 Tesla in a Mouse Model of Glycogen Storage Disease Type 1a.” *Journal of Lipid Research* 54 (7): 2010–22. <https://doi.org/10.1194/jlr.D033399>.
- Ratiney, H., A. Bucur, M. Sdika, O. Beuf, F. Pilleul, and S. Cavassila. 2008. “Effective Voigt Model Estimation Using Multiple Random Starting Values and Parameter Bounds Settings for in Vivo Hepatic 1H Magnetic Resonance Spectroscopic Data.” In *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, 1529–32. <https://doi.org/10.1109/ISBI.2008.4541300>.
- Ratiney, H., Y. Coenradie, S. Cavassila, D. van Ormondt, and D. Graveron-Demilly. 2004. “Time-Domain Quantitation of 1H Short Echo-Time Signals: Background Accommodation.” *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 16 (6): 284–96. <https://doi.org/10.1007/s10334-004-0037-9>.
- Reeder, Scott B., Houchun H. Hu, and Claude B. Sirlin. 2012. “Proton Density Fat-Fraction: A Standardized Mr-Based Biomarker of Tissue Fat Concentration.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 36 (5): 1011–14. <https://doi.org/10.1002/jmri.23741>.
- Reeder, Scott B., Zhifei Wen, Huanzhou Yu, Angel R. Pineda, Garry E. Gold, Michael Markl, and Norbert J. Pelc. 2004. “Multicoil Dixon Chemical Species Separation with an Iterative Least-Squares Estimation Method.” *Magnetic Resonance in Medicine* 51 (1): 35–45. <https://doi.org/10.1002/mrm.10675>.
- Ren, Jimin, Ivan Dimitrov, A. Dean Sherry, and Craig R. Malloy. 2008. “Composition of Adipose Tissue and Marrow Fat in Humans by 1H NMR at 7 Tesla.” *Journal of Lipid Research* 49 (9): 2055–62. <https://doi.org/10.1194/jlr.D800010-JLR200>.
- Ronti, Tiziana, Graziana Lupattelli, and Elmo Mannarino. 2006. “The Endocrine Function of Adipose Tissue: An Update.” *Clinical Endocrinology* 64 (4): 355–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x>.
- Rosqvist, Fredrik, David Iggman, Joel Kullberg, Jonathan Cedernaes, Hans-Erik Johansson, Anders Larsson, Lars Johansson, et al. 2014. “Overfeeding Polyunsaturated and Saturated Fat Causes Distinct Effects on Liver and Visceral Fat Accumulation in Humans.” *Diabetes* 63 (7): 2356–68. <https://doi.org/10.2337/db13-1622>.
- Ruxton, C. H. S., S. C. Reed, M. J. A. Simpson, and K. J. Millington. 2004. “The Health Benefits of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Review of the Evidence.” *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 17 (5): 449–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x>.
- Sadanathan, Suresh Anand, Bhanu Prakash, Melvin Khee-Shing Leow, Chin Meng Khoo, Hong Chou, Kavita Venkataraman, Eric Y.H. Khoo, et al. 2015. “Automated Segmentation of Visceral and Subcutaneous (Deep and Superficial) Adipose Tissues in Normal and Overweight Men.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 41 (4): 924–34. <https://doi.org/10.1002/jmri.24655>.
- Schick, Fritz, Beate Eismann, Wulf-Ingo Jung, Hilmar Bongers, Michael Bunse, and Otto Lutz. 1993. “Comparison of Localized Proton NMR Signals of Skeletal Muscle and Fat Tissue in Vivo: Two Lipid Compartments in Muscle Tissue.” *Magnetic Resonance in Medicine* 29 (2): 158–67. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910290203>.
- Schneider, Manuel, Felix Lugauer, Elisabeth Hoppe, Dominik Nickel, Brian M Dale, Berthold Kiefer, Andreas Maier, and Mustafa R Bashir. 2018. “Fat Content and Fatty Acid Composition Quantification Using a 3D Stack-of-Radial Trajectory With Adaptive Gradient Calibration.” In *Joint Annual Meeting of ISMRM-ESMRMB, 2773*. ISMRM.

- Sethi, Jaswinder K., and Antonio J. Vidal-Puig. 2007. "Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipose Tissue Function and Plasticity Orchestrate Nutritional Adaptation." *Journal of Lipid Research* 48 (6): 1253–62. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700005-JLR200>.
- Sharma, Puneet, Diego R. Martin, Nashiely Pineda, Qin Xu, Miriam Vos, Frank Anania, and Xiaoping Hu. 2009. "Quantitative Analysis of T2-Correction in Single-Voxel Magnetic Resonance Spectroscopy of Hepatic Lipid Fraction." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 29 (3): 629–35. <https://doi.org/10.1002/jmri.21682>.
- Silver, H. J., K. D. Niswender, J. Kullberg, J. Berglund, L. Johansson, M. Bruvold, M. J. Avison, and Eb Welch. 2013. "Comparison of Gross Body Fat-Water Magnetic Resonance Imaging at 3 Tesla to Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Obese Women." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21 (4): 765. <https://doi.org/10.1002/oby.20287>.
- Sinha, Ranjana, Sylvie Dufour, Kitt Falk Petersen, Vincent LeBon, Staffan Enoksson, Yong-Zhan Ma, Mary Savoye, Douglas L. Rothman, Gerald I. Shulman, and Sonia Caprio. 2002. "Assessment of Skeletal Muscle Triglyceride Content by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Lean and Obese Adolescents: Relationships to Insulin Sensitivity, Total Body Fat, and Central Adiposity." *Diabetes* 51 (4): 1022–27. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1022>.
- Škoch, Antonín, Zdeněk Tošner, and Milan Hájek. 2014. "The in Vivo J-Difference Editing MEGA-PRESS Technique for the Detection of n-3 Fatty Acids." *NMR in Biomedicine* 27 (11): 1293–99. <https://doi.org/10.1002/nbm.3189>.
- Snyder, WS, MJ Cook, ES Nasset, LR Karhausen, G Parry Howells, and IH Tipton. 1975. "Report of the Task Group on Reference Man." In . International Commission on radiological protection, no. 23. Pergamon Press: Oxford.
- Strobel, Klaus, Joerg van den Hoff, and Jens Pietzsch. 2008. "Localized Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Lipids in Adipose Tissue at High Spatial Resolution in Mice in Vivo." *Journal of Lipid Research* 49 (2): 473–80. <https://doi.org/10.1194/jlr.D700024-JLR200>.
- Stults-Kolehmainen, M A, P R Stanforth, J B Bartholomew, T Lu, C J Abolt, and R Sinha. 2013. "DXA Estimates of Fat in Abdominal, Trunk and Hip Regions Varies by Ethnicity in Men." *Nutrition & Diabetes* 3 (3): e64. <https://doi.org/10.1038/nutd.2013.5>.
- Timmers, Silvie, Ellen Konings, Lena Bilet, Riekelt H. Houtkooper, Tineke van de Weijer, Gijs H. Goossens, Joris Hoeks, et al. 2011. "Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans." *Cell Metabolism* 14 (5): 612–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.002>.
- Tomiya, A. J., J. M. Hunger, J. Nguyen-Cuu, and C. Wells. 2016. "Misclassification of Cardiometabolic Health When Using Body Mass Index Categories in NHANES 2005-2012" 40 (5): 883–86. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.17>.
- Tyagi, Avishkar, Omid Yeganeh, Yakir Levin, Jonathan C. Hooker, Gavin C. Hamilton, Tanya Wolfson, Anthony Gamst, et al. 2015. "Intra- and Inter-Examination Repeatability of Magnetic Resonance Spectroscopy, Magnitude-Based MRI, and Complex-Based MRI for Estimation of Hepatic Proton Density Fat Fraction in Overweight and Obese Children and Adults." *Abdominal Imaging* 40 (8): 3070–77. <https://doi.org/10.1007/s00261-015-0542-5>.
- Vanhamme, Leentie, Tomas Sundin, Paul Van Hecke, and Sabine Van Huffel. 2001. "MR Spectroscopy Quantitation: A Review of Time-Domain Methods." *NMR in Biomedicine* 14 (4): 233–46. <https://doi.org/10.1002/nbm.695>.
- Vanhamme, Leentje, Aad van den Boogaart, and Sabine Van Huffel. 1997. "Improved Method for Accurate and Efficient Quantification of MRS Data with Use of Prior



- Knowledge.” *Journal of Magnetic Resonance* 129 (1): 35–43. <https://doi.org/10.1006/jmre.1997.1244>.
- Wajchenberg, Bernardo Léo. 2000. “Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome.” *Endocrine Reviews* 21 (6): 697–738. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415>.
- Weis, Ján, Frédéric Courivaud, Michael Schacht Hansen, Lars Johansson, Lars Riisgaard Ribe, and Håkan Ahlström. 2005. “Lipid Content in the Musculature of the Lower Leg: Evaluation with High-Resolution Spectroscopic Imaging.” *Magnetic Resonance in Medicine* 54 (1): 152–58. <https://doi.org/10.1002/mrm.20518>.
- WHO expert consultation. 2004. “Appropriate Body-Mass Index for Asian Populations and Its Implications for Policy and Intervention Strategies.” *The Lancet* 363 (9403): 157–63. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15268-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15268-3).
- WHO Expert Consultation. 2008. *Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation, Geneva, 8-11 December 2008*. Geneva: World Health Organization.
- Yahya, Atiyah, and B. Gino Fallone. 2010. “T2 Determination of the J-Coupled Methyl Protons of Lipids: In Vivo Illustration with Tibial Bone Marrow at 3 T.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 31 (6): 1514–21. <https://doi.org/10.1002/jmri.22195>.
- Yeung, David K. W., Sik L. Lam, James F. Griffith, Amy B. W. Chan, Zhenyu Chen, Polly H. Tsang, and Ping C. Leung. 2008. “Analysis of Bone Marrow Fatty Acid Composition Using High-Resolution Proton NMR Spectroscopy.” *Chemistry and Physics of Lipids* 151 (2): 103–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.10.006>.
- Zancanaro, C., R. Nano, C. Marchioro, A. Sbarbati, A. Boicelli, and F. Osculati. 1994. “Magnetic Resonance Spectroscopy Investigations of Brown Adipose Tissue and Isolated Brown Adipocytes.” *Journal of Lipid Research* 35 (12): 2191–99.
- Zand, Kevin A., Amol Shah, Elhamy Heba, Tanya Wolfson, Gavin Hamilton, Jessica Lam, Joshua Chen, et al. 2015. “Accuracy of Multiecho Magnitude-Based MRI (M-MRI) for Estimation of Hepatic Proton Density Fat Fraction (PDFF) in Children.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 42 (5): 1223–32. <https://doi.org/10.1002/jmri.24888>.



## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : NEMETH

DATE de SOUTENANCE : 28/11/2018

Prénoms : Angéline, Géraldine

TITRE : Développement et validation de stratégies de quantification lipidique par imagerie et spectroscopie proton à 3.0T: Application à l'étude de la surnutrition

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2018LYSEI089

Ecole doctorale : EDISS (école doctorale interdisciplinaire science-santé)

Spécialité : Recherche clinique, innovation technologique

#### RESUME :

L'imagerie et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (IRM et SRM) sont des méthodes non-invasives qui ont le potentiel d'estimer in vivo la quantité et la qualité des adiposités abdominales. Le contexte scientifique et clinique de ce manuscrit s'articule autour de l'étude de surnutrition « Poly-Nut » dont l'un des objectifs est d'analyser les évolutions des tissus adipeux (TA) dans une phase rapide de prise de poids. L'originalité et la complexité de cette thèse résident dans le développement, l'adaptation et la comparaison de plusieurs méthodes quantitatives d'IRM et de SRM, pour l'étude du signal lipidique dans un contexte clinique à 3T. La fiabilité et la validation des mesures obtenues in vivo par ces techniques font ici l'objet d'une étude approfondie. Pour l'analyse quantitative du signal de spectroscopie, différentes méthodes existantes ont été comparées à celle développée spécifiquement pour notre étude clinique. L'estimation paramétrique par moindres carrés non linéaires appliquée aux spectres RMN des lipides peut conduire, selon la fonction modèle utilisée, à un problème non linéaire mal posé. Nous montrons alors que l'utilisation d'un modèle simplifié se fondant sur la structure d'une chaîne de triglycéride, comme utilisé récemment en imagerie quantitative, constitue une solution valide au regard de l'état de l'art. Ensuite différentes méthodes (IRM, SRM, Dual Energy X-ray absorptiometry, chromatographie en phase gazeuse) ont été utilisées pour caractériser les TA sous-cutanés et viscéraux. Le suivi par IRM du contenu lipidique du foie ainsi que du volume et de la composition en acide gras des TA à partir d'une unique acquisition en multi-écho de gradient est démontré. Enfin des développements expérimentaux menés parallèlement à l'étude clinique sur un imageur préclinique à 4,7T, comparent différentes stratégies d'encodage du déplacement chimique par imagerie et caractérisent des méthodes SRM pour estimer in vivo la proportion d'oméga-3 dans les chaînes d'acides gras.

MOTS-CLÉS : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, in vivo, estimation paramétrique, régression non linéaire, tissu adipeux, composition en acide gras, imagerie par résonance magnétique nucléaire

Laboratoire (s) de recherche : CREATIS - Centre de REcherche en Acquisition et Traitement de l'Image pour la Santé (UMR5220) – CNRS UMR 5220 – INSERM U1206 – Université Lyon 1 – INSA Lyon

Directeur de thèse : Olivier BEUF

Président de jury : Jean-Marie Bonny

Composition du jury : Florence Franconi, Hervé Saint-Jalmes, Jean-Marie Bonny, Luc Tappy, Denis Friboulet, Martine Laville, Hélène Ratiney, Olivier Beuf.