

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LYON 1

Ecole Doctorale Inter Science Santé

Spécialité : Ingénierie Biomédicale – Dispositifs médicaux

présentée par

**Nirilanto RAMAMONJISOA**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Lyon 1

**Spectroscopie de résonance magnétique**  
***in vivo* pour la mesure des lipides hépatiques :**  
***Application chez un modèle murin de glycogénose***

Soutenue le 25 Mars 2013 devant le jury composé de :

Olivier BEUF

Sophie CAVASSILA

Florence FAUVELLE

Laurence LE MOYEC

Fabienne RAJAS

Hélène RATINEY

Angèle VIOLA

Directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur



# Résumé

La glycogénose de type 1a (GSD1a) est une maladie génétique (prévalence : 1/100 000 naissances) due à un déficit de la sous-unité catalytique du complexe enzymatique glucose-6-phosphatase. Elle entraîne une incapacité de production de glucose endogène et une forte accumulation de lipides dans le foie et avec l'âge peut donner des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires.

L'objectif de cette thèse est de développer et de valider une méthodologie non invasive de mesure des lipides hépatiques par spectroscopie  $^1\text{H}$  de résonance magnétique (SRM) localisée pour un modèle murin de glycogénose (L-G6pc<sup>-/-</sup>) qui reproduit les symptômes hépatiques humains (hépatomégalie, stéatose).

Les développements méthodologiques réalisés ont permis l'estimation de la fraction lipidique hépatique, des proportions en acides gras saturés et insaturés et la mesure des temps de relaxation longitudinaux et transversaux de chaque groupement fonctionnel des acides gras.

La méthode proposée a d'abord été validée pour des échantillons *in vitro* d'acides gras simples et complexes. *In vivo*, la méthode proposée a permis l'étude de l'impact d'un régime alimentaire délétère chez le modèle murin de glycogénose et son contrôle. Deux régimes alimentaires sont considérés : un régime alimentaire riche en gras et en sucres et un régime alimentaire standard.

Chez les souris contrôles, les mesures de la quantité lipidique sont significativement plus élevées chez les souris sous régime riche en gras et en sucres que chez les souris sous régime standard.

Chez le groupe de souris modèle, qui développe spontanément une stéatose, la quantité lipidique élevée attendue est observée, bien qu'aucune différence significative ne soit constatée entre les deux régimes. Sous régime standard, les contributions des protons du groupement oléfinique sont mesurées significativement plus élevées chez les souris modèles. Aucun marqueur de polyinsaturation, illustré par les protons du groupement diallylique, n'a été significativement détecté chez les souris modèles.

Les mesures obtenues avec la technique de chromatographie gazeuse sont en accord avec les résultats de SRM.

## Abstract

Glycogen storage disease type 1a (GSD1a) is an autosomal recessive metabolic disorder (birth prevalence: 1/100 000) resulting in severe impairment of glucose production and large accumulation of liver fatty acids. Despite of a strict diet, patients with GSD1a develop, with age, multiple hepatocellular adenomas, ultimately transforming into hepatocellular carcinoma.

The aim of this work was to develop and to validate a proton magnetic resonance spectroscopy method with a mouse model of glycogenosis (*L-G6pc<sup>-/-</sup>*) which mimicking hepatic human's symptoms (hepatomegaly, steatosis).

This methodology includes estimation of hepatic fat fraction, saturated and insaturated components, calculation of longitudinal and transverse relaxation times of each chemical group for fatty acid.

This method was tested and validated with *in vitro* samples (simple fatty acid and triglycerides).

*L-G6pc<sup>-/-</sup>* mice and control mice were fed a standard diet or a high fat high sucrose diet (HFHS) during 9 months. In control mice, hepatic lipid content was found significantly higher with HF/HS diet than with standard diet. As expected, hepatic lipid content was already elevated in *L-G6pc<sup>-/-</sup>* mice fed a standard diet compared to control mice. *L-G6pc<sup>-/-</sup>* mice rapidly developed steatosis which was not modified by HF/HS diet. On standard diet, estimated amplitudes from olefinic protons were found significantly higher in *L-G6pc<sup>-/-</sup>* mice compared to control mice. *L-G6pc<sup>-/-</sup>* mice showed no noticeable polyunsaturation from diallylic protons. Total unsaturated fatty acid indexes measured by gas chromatography were in agreement with MRS measurements. These results showed the great potential of high magnetic field MRS to follow the diet impact and lipid alterations in mouse liver.

# Table des matières

Introduction

Chapitre I. Contextes clinique et technique.....	1
A. Contexte clinique : la glycogénose de type 1a .....	1
1. Physiologie du foie .....	1
2. La glycogénose de type 1a.....	10
B. Contexte technique .....	23
1. Les lipides .....	23
2. Techniques de détection et de quantification de la stéatose.....	27
3. Caractérisation et Analyse des lipides.....	32
4. Etudes par SRM de la stéatose et cancer hépatique .....	46
C. Conclusion.....	61
Chapitre II. Méthodologies.....	62
A. Matériel .....	62
1. Echantillons .....	62
2. Modèle animal.....	65
B. Méthode .....	69
1. La spectroscopie localisée .....	69
2. Chromatographie gazeuse.....	94
3. Dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques .....	95
4. Tests statistiques <i>in vivo</i> .....	95
5. Conclusion .....	95
Chapitre III. Résultats et discussion.....	96
A. Etudes <i>in vitro</i> à 4,7 T .....	96
B. Etudes à 7T .....	102
1. Analyse de l'huile de tournesol .....	102
2. Etudes <i>in vivo</i> à 7T.....	104
C. Conclusion.....	133
Conclusion générale et perspectives.....	135

# Liste des abréviations

ACC : Acetyl-CoA Carboxylase

AGL : Acides Gras Libres

AGNE : Acides Gras Non Estérifiés

AMARES : Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral fitting

ATGL : Adipose Triglyceride Lipase

ATP : Adénosine Triphosphate

ChREBP : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein

CG : Chromatographie Gazeuse

CRB : Cramér-Rao Bounds ou Bornes de Cramér-Rao

CV : coefficient de variation

DEN : Diethylnitrosamine

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

FAME : Fatty acid methyl esters

FAS : Fatty Acid Synthetase

FFA : Free Fatty Acid

FI : fraction d'insaturation

FID : Free Induction Decay ou Signal de Précession Libre (SPL)

G6P : Glucose-6-Phosphate

G6PC : Glucose-6-Phosphate Catalytic subunit

G6PT : Glucose-6-Phosphate Transporteur

GSD : Glycogen storage disease - Glycogénose

HCA : Hepatocellular Adenoma – Adénome hépatocellulaire

HCC : Hepatocellular Carcinoma – Cracinome hépatocellulaire

HDL : High density Lipoproteins

HFHS : High Fat High Sucrose

HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning

IIAG : Indice d'Insaturation Totale des Acides Gras

IITC : Indice d'Insaturation Totale des Chaînes

IRS : Insulin Receptor Substrate

IT : Insaturation Totale

LCModel : Linear Combination of Model

LDL : Low Density Lipoproteins

MUFA : MonoUnsaturated Fatty Acids

MSV : Multiple Starting Values

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non Alcoholic SteatoHepatitis

NEFA : Non Esterified Fatty Acid

PUFA : Polyunsaturated Fatty Acids

PRESS : Point-Resolved Spectroscopy

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSB : Rapport Signal sur Bruit

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis Factor - $\alpha$

SCD-1 : Stearoyl CoA Desaturase 1

SD : standard deviation - écart-type

SEM : standard error mean - erreur moyenne

SFA : Saturated Fatty Acids

SREBP-1c : Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1-c

SRM : spectroscopie de résonance magnétique

STD : standard

STEAM : Stimulated Echo Acquisition Method

TCA : TriCarboxylic Acid cycle (cycle de Krebs)

TE: temps d'écho

TG : triglycérides

TMS : TetraMethylSilane

TR: temps de répétition

UDP : Uridine-DiPhosphate

VAPOR : VArivable Pulse Power and Optimized Relaxation delay

VLDL : Very Light Density Lipoprotein



# Introduction

La stéatose hépatique non alcoolique (non alcoholic fatty liver ou NAFLD) est la manifestation de désordre hépatique la plus fréquente dans les pays industrialisés et l'incidence de la maladie ne fait qu'augmenter. Le terme de « stéatose hépatique » peut être défini comme une accumulation de lipides (principalement de triglycérides) dans le cytoplasme des hépatocytes, avec ou sans inflammation, nécrose ou fibrose. En l'absence de ces trois derniers éléments, la stéatose est dite « pure » ; elle est bénigne et potentiellement réversible. Dans 20 à 30% des cas, des signes histologiques de nécro-inflammation apparaissent, ce qui définit la stéatohépatite non alcoolique (non alcoholic steatohepatitis ou NASH). La NASH peut être associée à des lésions de fibrose et évoluer en une cirrhose ou en carcinome hépatocellulaire (Hepatocellular carcinoma, HCC) (Day and James, 1998; Lall et al., 2008). Dans certains cas, comme la glycogénose, la pathologie évolue directement de la stéatose à l'apparition d'adénomes hépatocellulaires (Hepatocellular adenoma, HCA), qui constituent la forme bénigne des carcinomes hépatocellulaires. La stéatose hépatique est fortement associée au syndrome métabolique et sa prévalence peut atteindre 50 à 90% chez les obèses et 70% chez les diabétiques. Les voies métaboliques qui conduisent à l'accumulation des lipides et notamment des triglycérides dans le foie sont multiples, mais l'apport excessif d'acides gras constitue une voie importante. En général, un foie est considéré stéatosique si son contenu lipidique excède 5% de son poids total (Hoyumpa et al., 1975; Brunt, 2007). Aujourd'hui, un examen histologique de biopsies du foie fournit l'évaluation la plus précise des lésions hépatiques. Cet examen considéré comme un « gold standard » permet de diagnostiquer différents stades de la maladie. Les inconvénients majeurs de cette technique sont son caractère invasif et les biais de diagnostic (faux négatifs). De plus, la biopsie ne permet pas un suivi des patients et est difficilement envisageable pour les enfants.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une modalité d'exploration non invasive du corps humain, aujourd'hui incontournable en radiologie. En présence d'un champ magnétique homogène et intense, il est également possible d'accéder à des informations moléculaires et de détecter les métabolites présents dans différents organes par spectrométrie de résonance ainsi que de déterminer des indicateurs intrinsèques des processus patho-physiologiques. L'exploration du foie par spectroscopie bénéficie de la localisation superficielle et du volume important de cet organe (Solga et al., 2005). Cependant, elle est rendue difficile par son mouvement. Les premières études de spectroscopie par résonance magnétique (SRM) *in vivo* du foie ont été réalisées en phosphore  $^{31}\text{P}$  (Cox et al., 1992) mais la spectroscopie proton a connu un essor très important ces dernières années. Jusqu'à récemment, les études par SRM dans le foie chez l'homme (Cho et al., 2001; Tarasow et al., 2002) et chez le petit animal (Ling and Brauer, 1992) étaient limitées par la faible résolution spectrale. Mais l'augmentation de l'intensité des champs magnétiques (4,7 T et plus), ainsi que les

techniques de localisation et l'introduction des techniques de synchronisation sur la respiration ont permis d'améliorer grandement la qualité des signaux de SRM chez le petit animal et d'obtenir par conséquent une information plus détaillée sur la composition lipidique intra-hépatique (Foley et al., 2001; Garbow et al., 2004).

L'objectif de cette thèse de doctorat est de développer une méthode quantitative d'exploration du foie fondée sur les techniques de SRM pour le diagnostic non invasif et fiable des pathologies hépatiques. Les développements méthodologiques dédiés à l'acquisition *in vivo* de signaux de spectrométrie proton localisée combinés aux développements de méthodes de traitement du signal spécifiques sont présentés. La méthode proposée a été appliquée pour l'analyse quantitative fiable du métabolisme fonctionnel intra-hépatique chez un modèle murin de glycogénose soumis à deux régimes alimentaires.

Ce mémoire est divisé en trois parties :

- La première partie présente le contexte clinique et technique du cadre de travail, en détaillant la glycogénose de type 1a, la stéatose hépatique non alcoolique ainsi que même que la technique de spectroscopie de résonance magnétique et la chromatographie gazeuse ;
- La seconde partie présente les matériels et méthodes employés au cours de cette étude. Elle décrit notamment les échantillons lipidiques, le modèle animal ainsi que la méthode mise en œuvre pour l'acquisition et le traitement des spectres de SRM ;
- Dans une troisième partie, les résultats de la validation de la méthode développée pour des échantillons lipidiques sont exposés. Enfin, la méthode est appliquée pour une étude *in vivo* d'un modèle murin de glycogénose, en vue de mesurer la quantité lipidique ainsi que la composition lipidique hépatique.



# Chapitre I. Contextes clinique et technique

Cette première partie vise à situer le contexte de la thèse, autant sur le plan clinique que technique.

## A. Contexte clinique : la glycogénose de type 1a

### 1. Physiologie du foie

#### 1.1 Anatomie

Le foie, chez l'homme, a une masse de 1200 g à 1500 g environ et est considéré comme la plus grande glande du corps. Il est subdivisé en quatre lobes : le lobe droit, le lobe gauche, le lobe carré, le lobe de Spigel ou lobe caudé. Sur une vue antérieure (Figure 1-a), dans la partie supérieure, le ligament falciforme sépare le lobe droit et le lobe gauche tandis que dans la partie inférieure, le ligament rond, dépasse légèrement le foie. La vésicule biliaire est également visible. Sur une vue postérieure (Figure 1-b), le lobe caudé est situé entre le lobe droit et le lobe gauche.

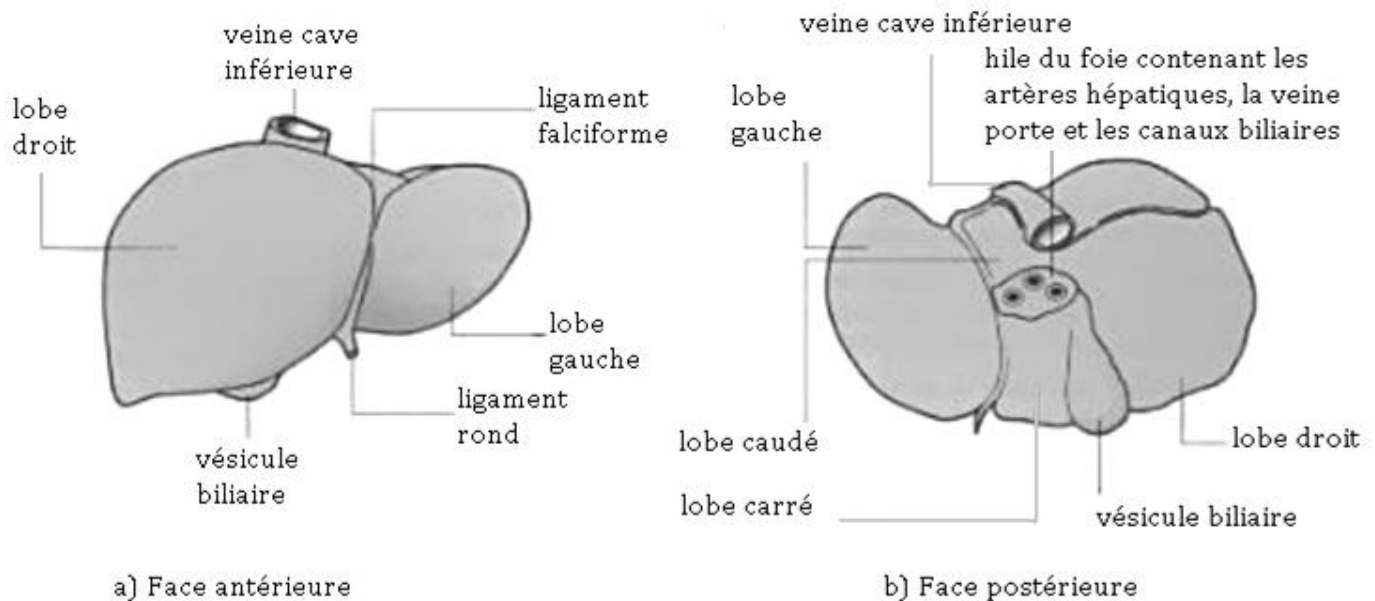


Figure 1 : Vues antérieure et postérieure du foie humain (schéma tiré de Nguyen, 2008)

Les voies principales de la vascularisation du foie ainsi que son unité fonctionnelle et structurelle (le lobule hépatique) sont représentés en Figure 2. Chaque lobule, de forme polygonale, est constitué d'un groupement de cellules hépatiques réparties en travées qui convergent vers une veine centrale ou veine centrolobulaire.

Ces veines centrolobulaires se rejoignent pour former la veine sus-hépatique avant de se jeter dans la veine cave inférieure.

A chaque coin du lobule se trouve un espace porte interlobulaire, formé par une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un canal biliaire (Figure 2), ces derniers constituent la triade portale. Des capillaires sanguins discontinus, les sinusoides, cheminent entre les travées, assurant un débit sanguin très lent et un contact très intime entre le sang et les hépatocytes. Les hépatocytes sont disposés en plateau selon une mince couche de cellules, avec une face en contact avec la sinusoides et une face en contact avec le sang portal.

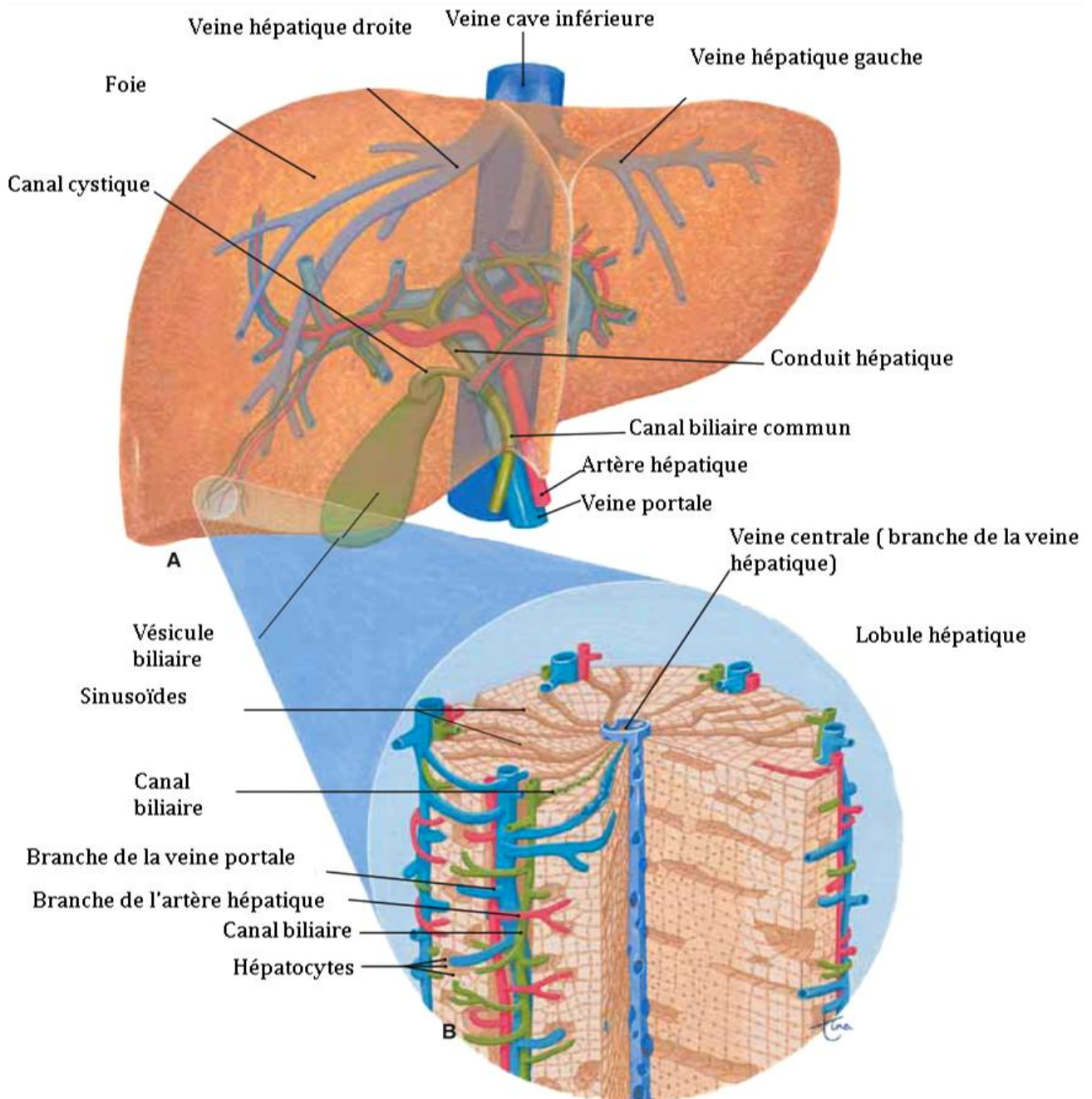


Figure 2 : A) Le foie et la vésicule biliaire, les vaisseaux sanguins et les voies biliaires. B) Architecture d'un lobule hépatique. (Figure tirée de Scanlon and Sanders, 2007)

Le foie est constitué de cinq types de cellules différents : les hépatocytes, les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules épithéliales des voies biliaires et les cellules stellaires ou d'Ito. L'espace de Disse définit l'espace entre les sinusoides et les hépatocytes.

Les hépatocytes représentent environ 60% des cellules du foie et 80% du volume du foie. Ils assurent la plupart des fonctions métaboliques du foie.

Les cellules de Kupffer sont des macrophages qui sont situés dans les sinusoides, jouant un rôle phagocytaire et endocytaire. Ils secrètent les médiateurs de la réponse inflammatoire (les dérivés réactifs de l'oxygène, les éicosanoïdes, du monoxyde d'azote, du monoxyde de carbone, le facteur de nécrose tumorale TNF-alpha et d'autres cytokines) et jouent un rôle dans la défense immunitaire innée. Ces cellules contribuent à évacuer les globules rouges sénescents et malformés, ainsi que les bactéries, mais participent également à la dégradation de l'hème en bilirubine et au remodelage de la matrice extracellulaire.

Les cellules endothéliales sinusoidales ou les endothéliocytes possèdent des pores larges, qui permettent à la plupart des protéines de passer librement à travers l'endothélium sinusoidal dans l'espace de Disse, où ces cellules entrent en contact avec les hépatocytes. Ces pores sont bi-directionnels et les protéines formées au sein des hépatocytes peuvent passer dans le sang.

Les cellules des canaux biliaires assurent le transport de la bile produite par le foie.

Les cellules stellaires se trouvent dans l'espace de Disse. Ces cellules présentent des gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques importantes. Dans le foie normal, les cellules stellaires stockent la vitamine A, contrôlent la synthèse de la matrice extracellulaire ainsi que la contractilité des sinusoides. Ces cellules se transforment en cellules qui produisent du collagène quand le foie est agressé, ce qui conduit à la fibrose.

D'importants échanges ont lieu au niveau du foie grâce à sa double vascularisation : une vascularisation qui dépend de l'artère hépatique et une autre qui dépend de la veine porte. L'artère hépatique et ses branches assurent la fonction nutritionnelle du foie en apportant un sang riche en oxygène aux cellules hépatiques. La veine porte draine la totalité du sang veineux provenant du tube digestif, achemine les nutriments absorbés dans la muqueuse intestinale jusqu'aux cellules hépatiques en vue de stockage et de transformation. La veine porte et ses branches assurent la circulation fonctionnelle du foie. Le sang qui provient de l'artériole et de la veinule circulent tous les deux dans la même direction, à travers les sinusoides vers la veine centrale, pour aller finalement vers la veine hépatique et la veine cave inférieure. La bile secrétée circule dans la direction opposée : à travers le canalicule biliaire loin de la veine centrale, vers la triade portale, et s'évacue selon la voie biliaire principale. (Nguyen, 2008)

La microcirculation hépatique a été définie selon deux représentations : soit selon le lobule ou selon un triangle virtuel, appelé acinus de Rappaport, reliant deux veines centrolobulaires avec l'espace porte. Ces représentations ont permis de définir trois zones :

- zone 1 : zone périportale ou périlobulaire ;
- zone 2 : zone médiolobulaire ;
- zone 3 : zone centrolobulaire.

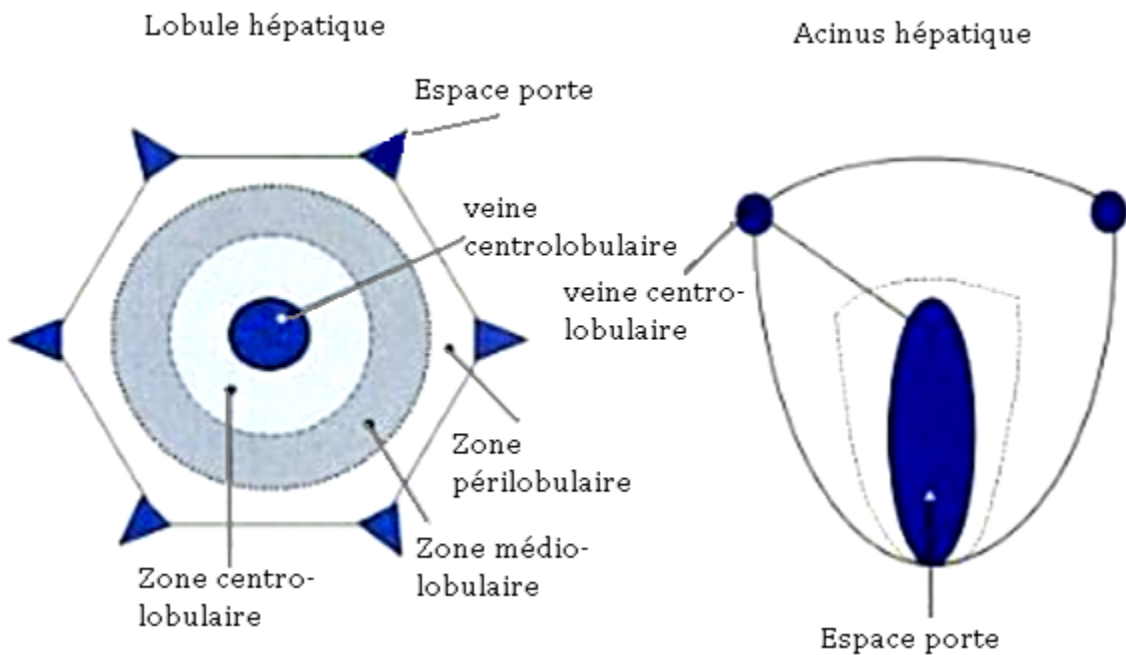


Figure 3 : Représentation schématique d'un lobule hépatique et d'un acinus hépatique. (schéma tiré de Martin et al., 2006)

Ces zones permettent d'étudier la topographie de la stéatose lors d'une lecture histologique en vue d'un diagnostic.

## 1.2 Fonctions

Le foie est au cœur de la transformation et/ou du stockage des sources d'énergie issues de l'alimentation et des organes extra-hépatiques qui utilisent ces énergies.

### 1.2.1 Métabolisme glucidique

Le foie intervient dans la régulation de la glycémie, soit en transformant le glucose en glycogène, selon la voie de la glycogénogenèse ou en libérant du glucose selon la voie de la glycogénolyse. Après un repas, la glycémie augmente jusqu'à une concentration de 120 à 150 mg/dL, dans les deux heures qui suivent. Le glucose est capté par les hépatocytes et est transformé en glucose 6-phosphate et ensuite en uridine-diphosphate glucose (UDP-glucose), qui entre ensuite dans la synthèse du

glycogène. Pendant les périodes de jeûne, le glycogène est dégradé en glucose-1-phosphate grâce à l'enzyme glycogène phosphorylase et à l'enzyme  $\alpha$ -1,6 glucosidase. Le glucose 1-phosphate est ensuite transformé en glucose-6-phosphate par l'enzyme phosphoglucomutase. L'enzyme glucose-6-phosphatase transforme le glucose-6-phosphate en glucose. La glycogénogenèse et la glycogénolyse sont régulées par des hormones, notamment l'insuline et le glucagon ou l'épinéphrine. Lorsque les stocks de glycogène hépatiques sont épuisés, le glucose est fourni par la voie de la néoglucogenèse, à partir de précurseurs non-glucidiques comme le glucose, les acides aminés et le lactate. Les trois tissus glucoformateurs sont le foie, les reins et l'intestin grêle, qui sont les seuls tissus à examiner la glucose-6 phosphatase (Rajas et al., 1999).

Ces mécanismes sont présentés en Figure 4.

Chez les patients diabétiques, la production endogène de glucose est fortement augmentée, entraînant une hyperglycémie.

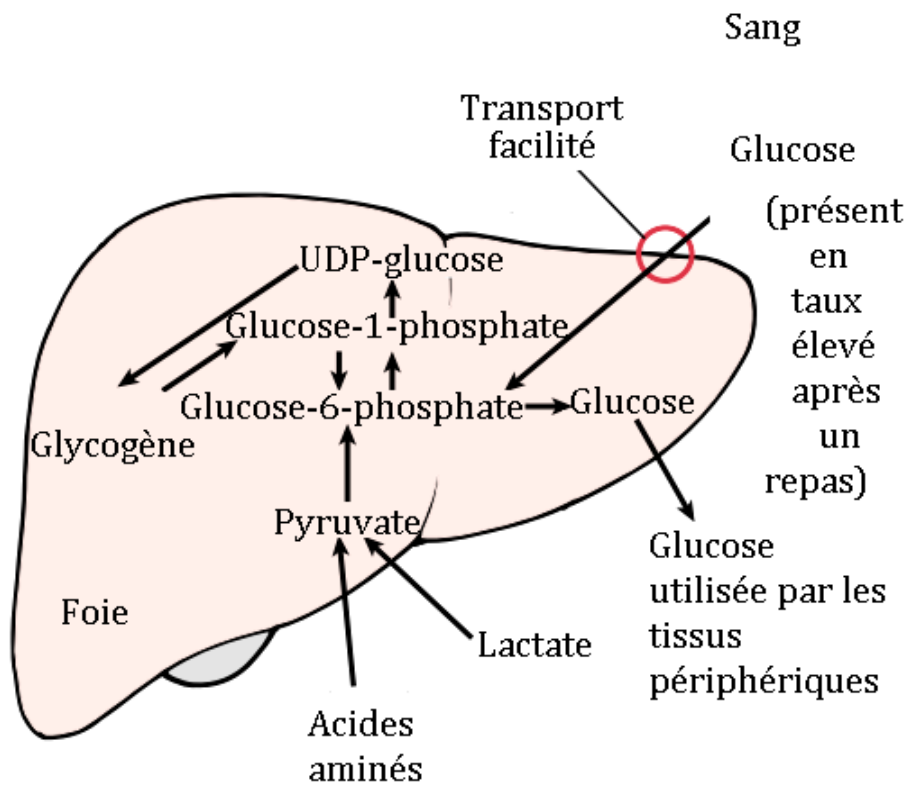


Figure 4 : Régulation du métabolisme glucidique dans le foie : le glucose peut pénétrer dans le foie selon une voie facilitée et peut être stocké sous forme de glycogène, qui peut ensuite être dégradé pour fournir du glucose aux tissus périphériques. Le foie peut également fournir du glucose à partir de substrats glucoformateurs : acides aminés ou lactate (figure issue de Tso, 2004).



### 1.3 Métabolisme des autres monosaccharides (fructose, galactose)

Certains tissus ne peuvent utiliser les autres monosaccharides comme le fructose et le galactose, qui sont transformés en glucose dans le foie. Le fructose est phosphorylé par la fructokinase pour former le fructose-1-phosphate, qui est ensuite métabolisé pour entrer dans la glycolyse ou la néoglycogénèse. Le galactose quand à lui est phosphorylé pour former le galactose-1-phosphate et réagit avec l'UDP-glucose pour former l'UDP-galactose et le glucose-1-phosphate. L'UDP-galactose peut ensuite intervenir dans la formation des glycoprotéines ou des glycolipides ou être transformé en UDP-glucose pour former du glycogène.

#### 1.3.1 Métabolisme protéique ou protidique

##### (a) Synthèse de 90% des protéines plasmatiques

Le foie est le siège de la synthèse des protéines, notamment de la majorité des protéines plasmatiques : le fibrinogène, la prothrombine, le facteur 8, l'alpha-globuline, la beta-globuline ainsi que l'albumine. L'albumine est une protéine liante, qui intervient dans la régulation osmotique du plasma mais assure en plus le transport des hormones, des acides aminés, des stéroïdes, des vitamines et des acides gras libres. Les autres protéines synthétisées dans le foie sont les protéines qui interviennent dans le transport du fer (transferrine, l'haptoglobine et l'hémopexine).

##### (b) Production de l'urée

Le foie synthétise la majorité de l'urée dans le corps, grâce à la voie du cycle de l'urée, à partir de l'ammoniac. L'ammoniac, produit par le catabolisme des acides nucléiques et des protéines, entre dans le métabolisme de l'azote et intervient dans la biosynthèse des acides aminés non essentiels et des acides nucléiques. L'ammoniac est hautement neurotoxique et un dysfonctionnement dans la détoxification de l'ammoniac par le foie peut induire des désordres neurologiques importants.

##### (c) Désamination/Transamination

Le foie synthétise douze (les acides aminés dits *non essentiels*) des vingt et un acides aminés nécessaires à l'élaboration de protéines. Les acides aminés dits *essentiels* sont fournis par l'alimentation. Le foie peut synthétiser des acides aminés *non essentiels* à partir d'acides aminés *essentiels*, comme par exemple la tyrosine qui peut être synthétisé à partir de la phénylalanine. Cette synthèse peut se faire par transamination. La transamination est le transfert du groupe amine NH<sub>2</sub> d'un acide aminé présent en excès vers une chaîne carbonée libre pour former un nouvel acide aminé. Certains acides aminés en excès, qui ne rentreraient pas immédiatement dans la synthèse des protéines, ne peuvent être stockés. Ces acides aminés, par désamination (le groupe NH<sub>2</sub> est enlevé

de l'acide aminé), peuvent être convertis en glucides ou en acide gras. Ainsi, les acides aminés en excès sont utilisés pour la production d'énergie.

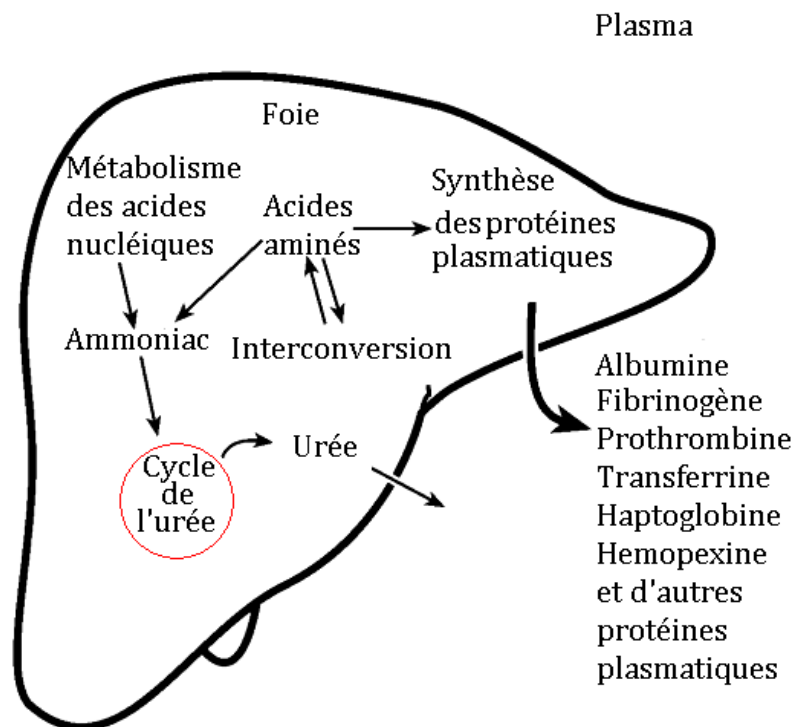


Figure 5 : Régulation du métabolisme des acides aminés et des protéines dans le foie : la production de la majorité des protéines plasmatiques, la transformation de l'ammoniac en urée et la synthèse de certains acides aminés. (Figure issue de Tso, 2004)

### 1.3.2 Métabolisme lipidique

Les lipides de l'alimentation sont essentiellement constitués de triglycérides, qui sont des lipides neutres, issus de la combinaison de trois acides gras et d'un glycérol. Les principaux acides gras présents dans le corps humain sont l'acide stéarique, l'acide oléique et l'acide palmitique (Guyton and Hall, 2006). Une présentation plus détaillée des différents types de lipides est donnée dans la partie B de ce chapitre (B.1).

Le foie est le lieu de la synthèse des acides gras ainsi que des lipoprotéines. Son rôle diffère selon la période postprandiale ou absorptive (2 à 4 heures après un repas) et la période post absorptive (4 à 12 heures après un repas) mais également lors d'un jeûne (12 à 24 heures et au-delà après un repas).

En période postprandiale : le foie transforme le glucose en acides gras grâce à l'acétylCoA. Ces acides gras seront délivrés dans le sang grâce aux VLDL (Very Light Density Lipoproteins). Le foie peut également recevoir des acides gras grâce aux chylomicrons, qui seront transformés en VLDL.

En période post absorptive ou lors d'un jeûne, les lipides sont mobilisés du tissu adipeux et transportés sous la forme d'acides gras libres, ce qui est réalisé à la suite d'une hydrolyse des triglycérides en acides gras et en glycérol. Ces acides gras sont ensuite pris en charge par le foie. Ils sont utilisés par les hépatocytes pour fournir de l'énergie

via la  $\beta$ -oxydation, pour générer les corps cétoniques et synthétiser les triglycérides nécessaires pour la formation des lipoprotéines de très faible densité (VLDL).

#### (a) Synthèse et oxydation des acides gras

Le foie est l'un des sites importants de la synthèse des acides gras. Les acides gras issus du plasma peuvent être métabolisés dans la mitochondrie des hépatocytes par la  $\beta$ -oxydation afin de fournir de l'énergie. Lors de la  $\beta$ -oxydation, les acides gras, qui sont les acides gras libres (AGL) (ou acides gras non estérifiés, AGNE) sont décomposés afin de former l'acétylCoA, qui entre dans le cycle de Krebs (TCA, tricarboxylic acid cycle) pour la production d'ATP. Cet acétylCoA peut servir également de carburant et produire l'acide palmitique par la lipogénèse, qui a lieu dans le cytosol, en consommant de l'ATP. Dans cette voie, l'acétyl-CoA est activé en malonyl coA grâce à l'acétyl-CoA carboxylase, puis subit une élongation par le complexe acide gras synthase. Les autres acides gras sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique à la suite de l'élongation ou de la désaturation de l'acide palmitique, via des enzymes. Chez les mammifères, la capacité d'introduire plusieurs doubles liaisons entre atomes de carbone est limitée, ils doivent faire appel aux acides gras « essentiels » qui seront fournis par l'alimentation.

#### (b) Synthèse des lipoprotéines

Les lipides, insolubles dans l'eau, circulent dans le plasma en association à des protéines, les « apoprotéines », et deviennent des lipoprotéines. Les quatre principales classes de lipoprotéines circulant dans le foie sont les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de faible densité (Low density Lipoproteins, LDL), les lipoprotéines de haute densité (High density Lipoproteins, HDL). Ces lipoprotéines diffèrent par leur composition chimique, qui reflète la proportion de la protéine par rapport au cholestérol.

Les chylomicrons sont synthétisés à partir des triglycérides alimentaires et les cholestérols esters par les cellules épithéliales de l'intestin. Dans leur composition, les chylomicrons présentent en majorité des triglycérides, 9% de phospholipides, 3% de cholestérol et 1% d'apoprotéines B. Les chylomicrons transportent les triglycérides à partir de l'intestin vers le muscle ou le tissu adipeux à la suite d'un repas. Dans les capillaires du tissu adipeux ou du muscle, les acides gras entrent dans les tissus pour être stockés et le glycérol est capté par le foie. Les chylomicrons sont ensuite convertis en résidus de chylomicrons (chylomicrons remnants), qui seront captés par les hépatocytes du foie.

Les LDL présentent un taux faible en protéines et un taux élevé en cholestérol. Ils transportent le cholestérol aux tissus, afin que celui-ci participe à la synthèse des membranes cellulaires ou à des sécrétions cellulaires. Les LDL sont les principaux fournisseurs de cholestérol aux tissus. Dans le cadre de l'hypercholestérolémie, le foie ne produit plus les récepteurs aux LDL, ce qui ne lui permet plus de capter les LDL du sang. Ces LDL sont aussi appelés « mauvais cholestérol » car cette forme de cholestérol se

dépose plus facilement sur les parois des vaisseaux sanguins, conduisant à l'athérosclérose.

Les HDL, qui contiennent un taux plus élevé de protéines que de cholestérol (en comparaison avec les LDL), transportent le cholestérol des tissus au foie. Les HDL sont considérés comme du "bon cholestérol" car cette forme de cholestérol peut facilement être éliminé du sang par le foie et excrété par la bile.

Un régime pauvre en proportion d'acides gras total, mais riche en acides gras polyinsaturés, tend à élever le taux de HDL et diminuer le taux de LDL.

Les VLDL du foie sont associés à une autre classe de protéines : les apolipoprotéines B (apoB). Les deux formes circulantes des apoB sont la B48 et la B100. Le foie humain ne produit que l'apo-B100, qui participe à la sécrétion des VLDL. Quand la sécrétion des VLDL est bloquée, comme chez les patients atteints d'A-beta-lipoprotéïnémie, le cytoplasme des hépatocytes de ces patients présente de larges vacuoles lipidiques. Les VLDL transportent les triglycérides synthétisés dans le foie vers les tissus périphériques.

La formation et la sécrétion des lipoprotéines par le foie sont régulées par des précurseurs et des hormones, comme les œstrogènes et l'hormone thyroïdienne.

#### (c) La production de corps cétoniques

Les corps cétoniques sont les carburants de nombreux tissus, excepté le foie bien que les corps cétoniques soient produits dans le foie. Même si le glucose est le carburant préférentiel pour le cerveau, il arrive que lors d'un jeûne prolongé, le cerveau utilise les corps cétoniques (l'acétoacétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate) comme énergie.

#### (d) Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est issu de la synthèse *de novo* et des lipoprotéines prises en charge par le foie. Ce cholestérol intervient dans la formation des acides biliaires, la synthèse des VLDL et la synthèse des membranes du foie. Les VLDL sécrétés par le foie fournit du cholestérol aux organes qui en ont besoin pour la synthèse des hormones stéroïdiens (les glandes surrénales, les ovaires, les testicules).

### 1.3.3 Fonction biliaire

La bile est produite par le foie joue un rôle essentiel dans la digestion chimique dans l'intestin grêle et dans l'absorption des nutriments par l'épithélium intestinal. Elle transporte aussi la bilirubine ainsi que l'excès de cholestérol aux intestins afin d'y être éliminé dans les selles. Ce transport se fait en amont grâce aux petits canaux biliaires des cellules du foie, qui se regroupent pour former de larges canaux pour finalement former le canal hépatique, qui achemine la bile hors du foie. Le canal hépatique et le canal cystique de la vésicule biliaire se rejoignent pour former le canal cholédoque, qui achemine la bile jusqu'au duodénum. La production de la bile est stimulée par la

sécrétine, hormone formée par le duodénum quand les aliments arrivent au niveau de l'intestin grêle.

#### 1.3.4 Autres fonctions

Parmi ses autres fonctions, le foie participe par ailleurs :

- A la synthèse de la bilirubine ;
- Au stockage de certaines vitamines ;
- Au métabolisme du fer ;
- Au métabolisme des xénobiotiques.

## 2. La glycogénose de type 1a

Les glycogénoses sont des maladies génétiques, autosomiques et récessives, touchant les enzymes du métabolisme du glycogène, au niveau hépatique ou musculaire. Les glycogénoses de type 1 sont dues à un déficit en glucose-6 phosphatase, entraînant une perte de la production endogène de glucose, responsable d'hypoglycémies sévères.

### 2.1 Le système enzymatique glucose-6 phosphatase

L'enzyme glucose-6-phosphatase catalyse l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (G6P) en glucose et en phosphate inorganique (Pi). Le système enzymatique glucose-6-phosphatase est un enzyme du réticulum endoplasmique composé d'une unité catalytique (G6PC), dont le substrat est le glucose-6-phosphate, et d'une unité transportrice (G6PT) qui achemine le glucose-6-phosphate du cytosol vers le lumen du réticulum endoplasmique. Cet enzyme peut être représenté selon le modèle de la Figure 6.

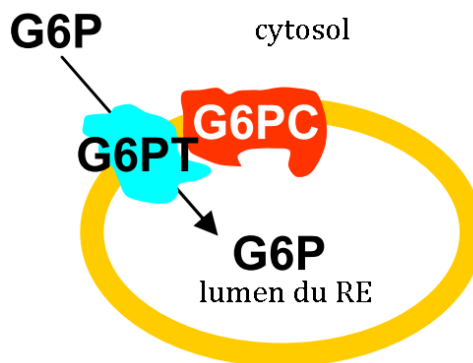


Figure 6 : Modèle du complexe enzymatique multiple : le glucose-6-phosphate (G6P) entre dans le lumen du réticulum endoplasmique grâce à un premier transporteur, puis est hydrolysé grâce à l'unité catalytique G6PC en glucose(Glc)

Les mutations de l'unité catalytique G6PC sont responsables de la glycogénose de type 1a (GSD 1a) tandis que les mutations de transporteur du glucose-6-phosphate sont à l'origine de la glycogénose de type 1b (GSD 1b).

## 2.2 Physiopathologie métabolique et hépatique

La prévalence de la GSD1 est estimée à 1/100 000 naissances. Les patients atteints de glycogénose de type 1a présentent de sévères hypoglycémies, une stéatose hépatique (accumulation de triglycérides dans le foie), de sévères hypoglycémies, une hépatomégalie, une hyperlipidémie, une hyperlactacidémie et une hyperuricémie. Un retard de croissance est un signe fréquent, mais qui peut être amélioré par un bon contrôle métabolique. Une ostéopénie peut être également rencontrée. Les complications à long-terme peuvent être retardées si un contrôle métabolique optimal est réalisé. Le développement d'adénomes hépatocellulaires survient dans 75 % des cas. Des complications rénales peuvent survenir, allant jusqu'à l'insuffisance rénale. Au niveau du foie, l'accumulation de glucose-6 phosphate va conduire à l'activation des voies de la glycolyse (entraînant l'hyperlactatémie), des pentoses phosphates (entraînant l'hyperuricémie), de la glycogénosynthèse (entraînant l'hépatomégalie due à l'accumulation du glycogène), de la lipogenèse de novo (entraînant l'accumulation de triglycérides et le développement de la stéatose). Ces voies sont synthétisées à la Figure 7.

Bandsma et al., 2008 ont essayé de caractériser la lipogenèse chez les patients atteints de GSD 1a. Leur étude révèle que les patients atteints de GSD 1a présentent une élévation de la synthèse *de novo* des lipides par rapport aux sujets contrôles. Chez ces patients, cette synthèse des lipides *de novo* serait favorisée par l'activation de ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein). Un taux de G6P élevé active cette protéine en régulant son entrée du cytosol vers le noyau.

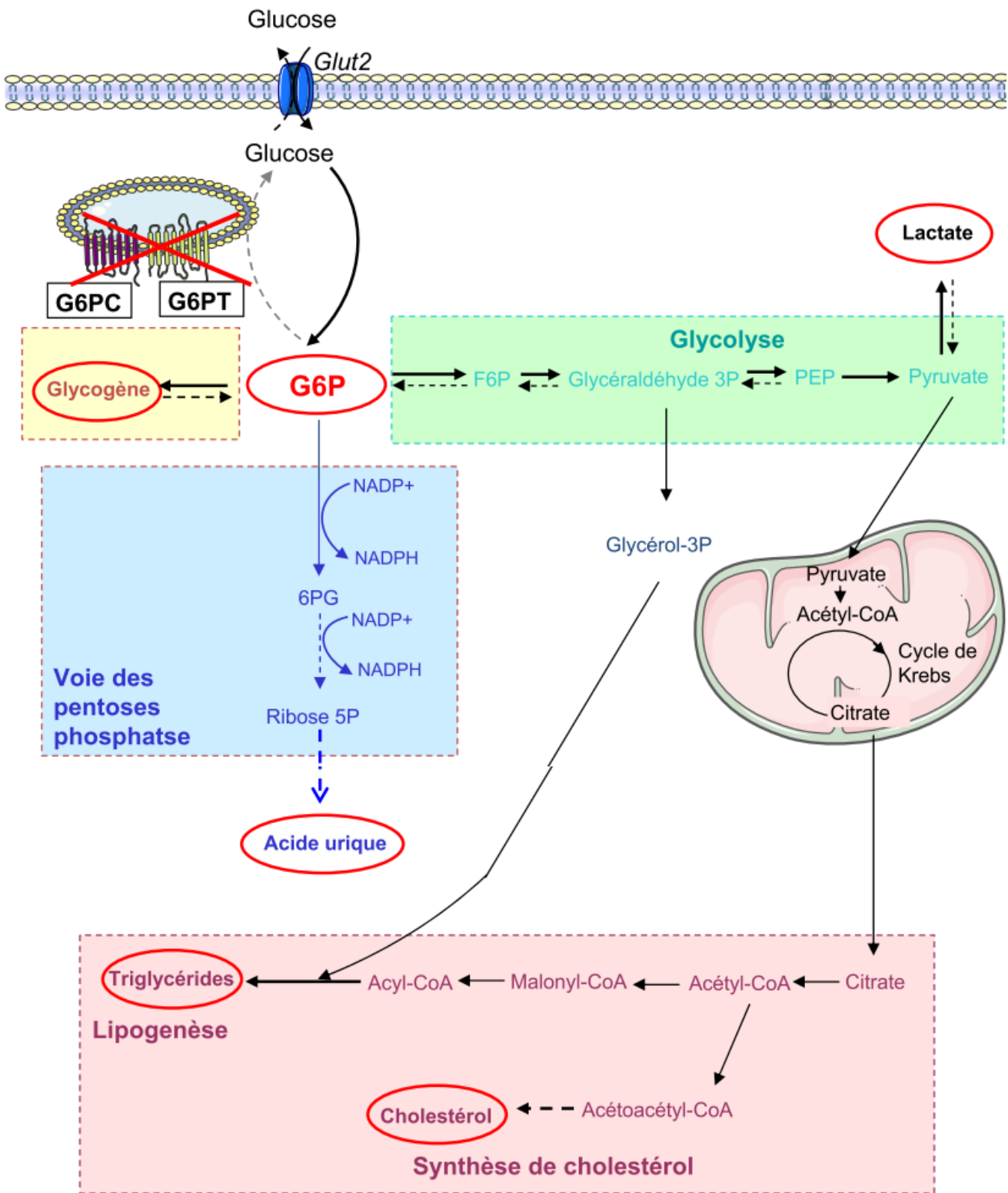


Figure 7 : Voies métaboliques activées en absence de glucose-6 phosphatase (G6Pase) : en absence d'activité G6Pase, l'accumulation de G6P au sein de l'hépatocyte entraîne l'activation des voies de synthèse de glycogène, de la glycolyse, de la lipogenèse, de la synthèse de cholestérol et des pentoses phosphates. Figure adaptée de Postic, 2008. PEP: Phosphoénol pyruvate; 6PG: 6-phosphogluconolactone

### 2.3 Traitements actuels

Les traitements ont pour but de prévenir l'hypoglycémie et l'hyperlactacidémie ainsi que d'assurer un développement normal de l'enfant. Le traitement est surtout diététique. Le régime alimentaire consiste en des repas fréquents, en une nutrition entérale nocturne à débit constant, à une consommation de glucides à absorption lente (amidon sous forme de maïzena crue) et une restriction dans la consommation de fructose et de galactose, ces derniers favorisent l'hyperlactacidémie. Les apports caloriques journaliers doivent être contrôlés, car une insuffisance ne corrigerait pas les désordres métaboliques et produirait un retard de développement et un excès conduirait à l'obésité. Les apports caloriques devraient comporter 60-65% de glucides, 10-15 % de protéines et 25-30% de lipides.

Un suivi des paramètres cliniques (courbe de croissance, indice de masse corporelle, l'importance de l'hépatomégalie, la pression sanguine,..) et biologiques (glycémie préprandiale, triglycémie, ...) est réalisé afin d'évaluer l'efficacité du traitement.

Afin de mieux comprendre cette maladie, des modèles animaux ont été étudiés. Les modèles canins (Specht et al., 2011) présentent des symptômes cliniques et pathologiques similaires à l'homme, y compris une acidose lactique, qui n'est pas forcément présent chez les modèles murins. Cependant, la génération de modèles canins atteints de glycogénose de type 1a impliquent un investissement élevé en temps, en travail et en finance.

Récemment, un modèle murin de glycogénose de type 1a a été généré avec une invalidation spécifique dans le foie (Mutel et al., 2011) et présente à la fois une stéatose et un développement d'adénomes. Ce modèle sera détaillé ultérieurement, mais les mécanismes biologiques à l'origine d'une stéatose ainsi que le développement d'adénomes sont similaires à ceux observés dans le modèle animal et chez l'homme.

### 2.4 Modèle considéré dans l'étude : modèle de stéatose avec un développement d'adénomes

#### 2.4.1 Stéatose hépatique non alcoolique chez l'homme

Les stéatoses non alcooliques (Non Alcoholic fatty Liver Disease NAFLD en anglais) représentent un spectre de maladies qui va de la stéatose simple, qui peut évoluer en stéatohépatite (Non Alcoholic Steato Hepatitis, NASH) avec l'apparition de fibrose, puis en cirrhose et qui peut aboutir à des carcinomes hépatocellulaires (Hepatocellular carcinoma, HCC). Le terme « non alcoolique » se réfère à une absence ou à une faible consommation d'alcool (inférieur à <10g par jour, l'équivalent de 25 cl de bière). Les hépatites alcooliques, dues à une forte consommation d'alcool présentent le même spectre de pathologies. La Figure 8 représente l'évolution naturelle des stéatoses non alcooliques.



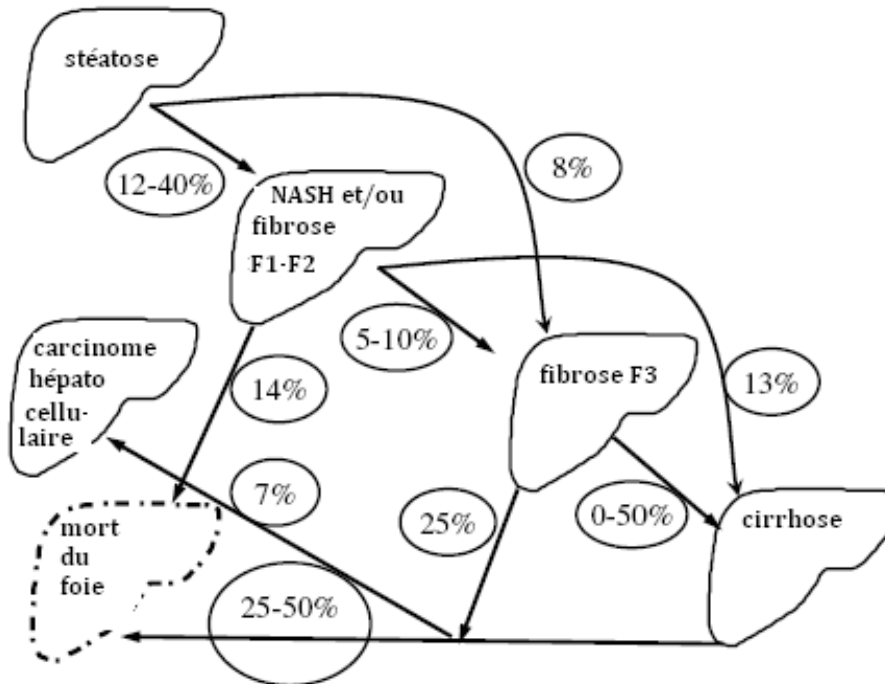


Figure 8 : Evolution naturelle de la stéatose non alcoolique (NAFLD). Les pourcentages indiquent les probabilités d'évolution d'un état à un autre. Les types de fibroses F1-F3 sont des grades définis selon l'intensité de l'atteinte identifiée par histologie. Figure reproduite d'après de Alwis and Day, 2008.

(a) La stéatose

**La stéatose** est définie comme une accumulation de graisses, notamment des triglycérides, supérieure à 5% du poids du foie. La stéatose touche 20-30% de la population générale dont 2-3% vont développer une stéatohépatite. Elle est fortement associée à l'obésité et au diabète. La classification de l'obésité et du surpoids est définie selon l'indice de masse corporelle (IMC), calculé comme suit :

$$IMC = \frac{\text{poids(kg)}}{\text{taille}^2 \text{ (m)}}$$

Un IMC normal est compris entre 18,5 et 24,9. Une personne en surpoids aura un IMC entre 25 et 29,9. L'obésité modérée est comprise entre 30 et 34,9, l'obésité sévère entre 35 et 39,9, l'obésité massive au-delà de 40. La stéatose est présente chez 70% des sujets diabétiques et chez 65-75% chez les sujets obèses avec un taux de 85-90% chez les sujets atteints d'obésité morbide (de Alwis and Day,  $IMC > 20 \text{ kg/m}^2$ , 2008).

Lors de son diagnostic par histologie, l'intensité de la stéatose peut être classée selon le pourcentage des hépatocytes « stéatosiques » (identifiés par la présence de gouttelettes lipidiques).

Selon Kleiner et al., 2005, elle est qualifiée de :

- légère si elle implique <33% des hépatocytes et correspond au grade 1.
- modérée si elle implique <66% hépatocytes et correspond au grade 2.

- sévère si elle implique >66% des hépatocytes et correspond au grade 3.

Elle peut être de deux types :

- microvacuolaire : où de nombreuses petites gouttelettes lipidiques occupent le cytoplasme de l'hépatocyte qui augmente de volume ;
- macrovacuolaire : où une vacuole volumineuse lipidique unique occupe l'hépatocyte.

La topographie de la stéatose doit être également précisée : si elle diffuse (aucune localisation particulière), périportale ou centrolobulaire.

#### (b) Rôle de la lipogenèse dans le développement de la stéatose hépatique

L'accumulation de triglycérides dans le foie est due soit à une surproduction de triglycérides soit à une déficience d'export des triglycérides.

Une étude réalisée chez des patients atteints de NAFLD a révélé que les triglycérides hépatiques viennent de trois sources différentes : 1) l'alimentation (15%), 2) la synthèse *de novo* (60%) ( la lipogenèse *de novo*) et 3) le tissu adipeux (26%)(Donnelly et al., 2005). Les mécanismes intervenant dans l'accumulation des triglycérides sont présentés en Figure 9. Sous l'influence de l'insuline et du glucose, les protéines SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c) et ChREBP sont activées et induisent l'expression des gènes lipogéniques, comme l'Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), la Fatty ACid Synthetase (FAS), la Steryl CoA Desaturase 1 (SCD 1).

L'invalidation du facteur de transcription ChREBP a entraîné chez des souris une baisse de la synthèse des acides gras de 65% inférieurs aux souris contrôles (Iizuka et al., 2004). Les triglycérides sont ensuite estérifiés et exportés en tant que VLDL ou oxydés. Une anomalie sur chacune de ces voies peut également être à l'origine de l'accumulation des triglycérides dans le foie. Parmi ces anomalies, une mutation du gène qui code l'adipose triglyceride lipase (ATGL) empêche la mobilisation des acides gras libres des vacuoles lipidiques. Ainsi, chez des souris où le gène codant l'ATGL a été invalidé, une stéatose périportale macrovésiculaire et une stéatose péricentrale microvésiculaire ont été constatées sans que les taux de glucose et de triglycérides plasmatiques ne soient différents des souris contrôles (Wu et al., 2011). L'exportation des triglycérides par les VLDL peut être altérée par les mutations des protéines entrant dans la constitution ou l'élaboration des VLDL (apolipoprotéine apo B, Microsomal Triglyceride transfer protein, MTP).

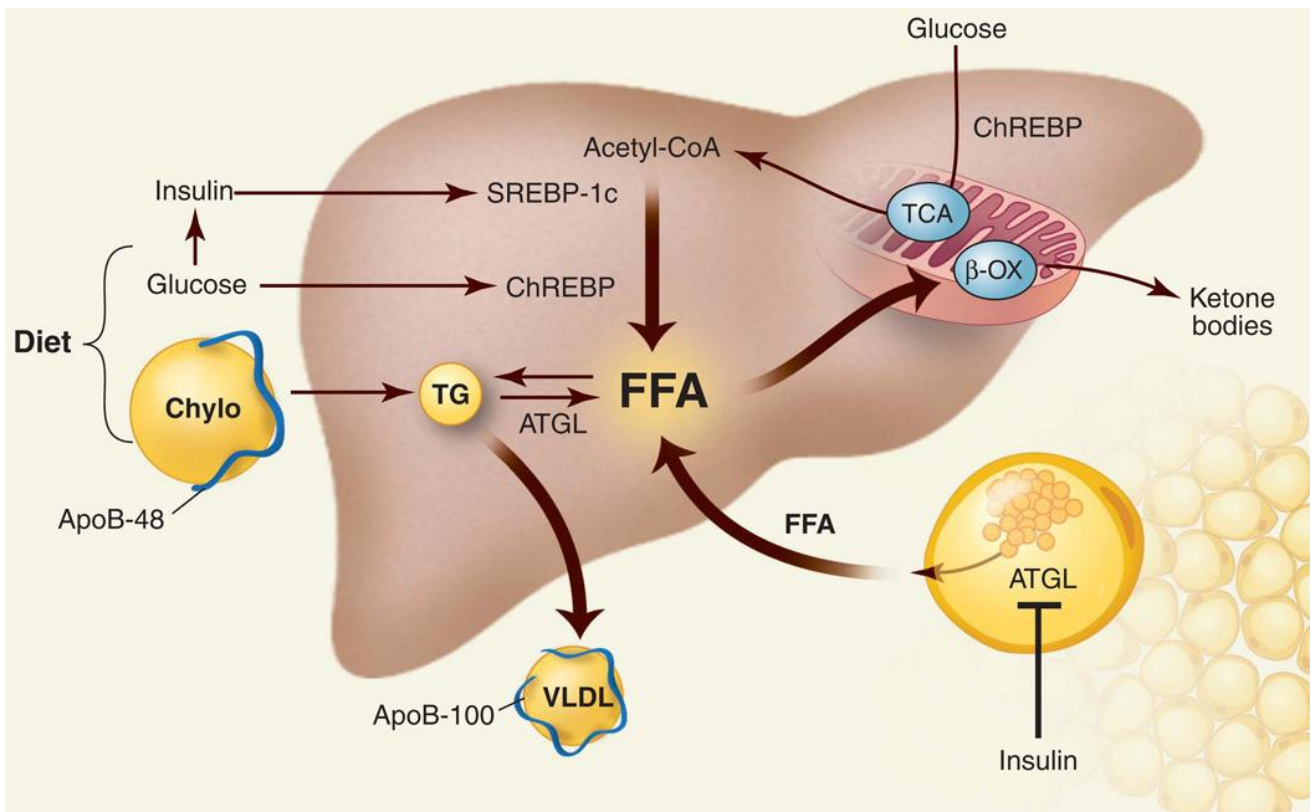


Figure 9 : Origines potentielles des acides gras libres : l'alimentation, la synthèse endogène et le tissu adipeux. Ces acides gras peuvent être métabolisés par la  $\beta$ -oxydation ( $\beta$ -OX) dans la mitochondrie, estérifiés et stockés en tant que triglycérides dans les gouttelettes lipidiques, ou comme précurseurs pour d'autres lipides (absents sur le schéma) ou associés avec les apoB en VLDL et sécrétés dans le sang. Les processus qui sont à l'origine de l'élévation des apports en acides gras libres et en triglycérides ou de la baisse de la capacité d'exportation des acides gras libres et des triglycérides provoquent la stéatose hépatique. Les apports en glucides élèvent le taux de glucose et d'insuline, ce qui active deux facteurs de transcription dans le foie qui favorise la lipogenèse *de novo* : ChREBP et SREBP-1c. L'insuline inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux en supprimant l'ATGL (Adipose Triglyceride Lipase). Chylo : chylomicron, TCA : tricarboxylic acid (schéma issu de Cohen et al., 2011)

La stéatose est associée à une résistance à l'insuline (Sakurai et al., 2007). La résistance à l'insuline, qui caractérise le diabète de type 2, est décrite comme la réduction de la réponse du foie, des muscles et du tissu adipeux à l'insuline. Une accumulation de diglycérides (diacylglycérols, DAG) dans le cytosol des vacuoles lipidiques serait un bon prédicateur de la résistance à l'insuline chez des sujets obèses (Kumashiro et al., 2011).

La stéatose est également reconnue comme étant la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique a été défini par la fédération internationale du diabète comme étant une association d'au moins deux des quatre facteurs (hyperlipidémie, hypertension, hyper insulinémie, hyperglycémie) résumés dans la Table 1 pour des hommes ayant un tour de taille supérieur ou égale à 94 cm (ou un tour de taille supérieur ou égale à 80 cm pour les femmes). Sa prévalence est telle qu'elle atteint actuellement un quart de la population mondiale. Chaque symptôme

présente un facteur de risque pour la santé et doit être pris en considération. L'hyperlipidémie est souvent due à un mauvais régime alimentaire et à un manque d'exercice. L'hyper-insulinémie prédispose au développement du diabète de type 2.

Facteurs	Critère
Triglycérides H/F	$\geq 150$ mg /dL (1,7 mmol/L)
cholestérol- lipoprotéines de haute densité	$< 40$ mg/dL (1,03 mmol/L) (Homme) $< 50$ mg/dL (1,03 mmol/L) (Femme)
Pression artérielle (hypertension)	Systolique $\geq 130$ mmHg Diastolique $\geq 85$ mm Hg
Glycémie	$\geq 100$ mg/dL (5,6 mmol/L)

Table 1 : Symptômes du syndrome métabolique (H : homme, F : femme).

**La stéatohépatite** est définie comme une stéatose s'accompagnant d'inflammation et de fibrose.

La pathogenèse de la NASH n'est pas encore totalement élucidé mais une hypothèse qualifiée des deux atteintes ou « two hits hypothesis » a été proposée. Cette hypothèse affirme que l'accumulation de triglycérides (« first hit ») rend le foie vulnérable et l'induit à développer des réponses inflammatoires suite à plusieurs stimuli (« second-hit »). Parmi ces stimuli, nous pouvons citer le stress oxydant, qui entraîne une peroxydation des lipides, les cytokines pro inflammatoires, les adipokines ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial (Rolo et al., 2012).

**La fibrose** est caractérisée par l'envahissement du foie par des fibres de collagène.

**La cirrhose** représente un stade avancé de la fibrose associée à une nécrose du tissu, avec une distorsion de la vascularisation hépatique (Preiss and Sattar, 2008).

La Figure 10 présente les aspects histologiques du foie selon le spectre de la NAFLD.

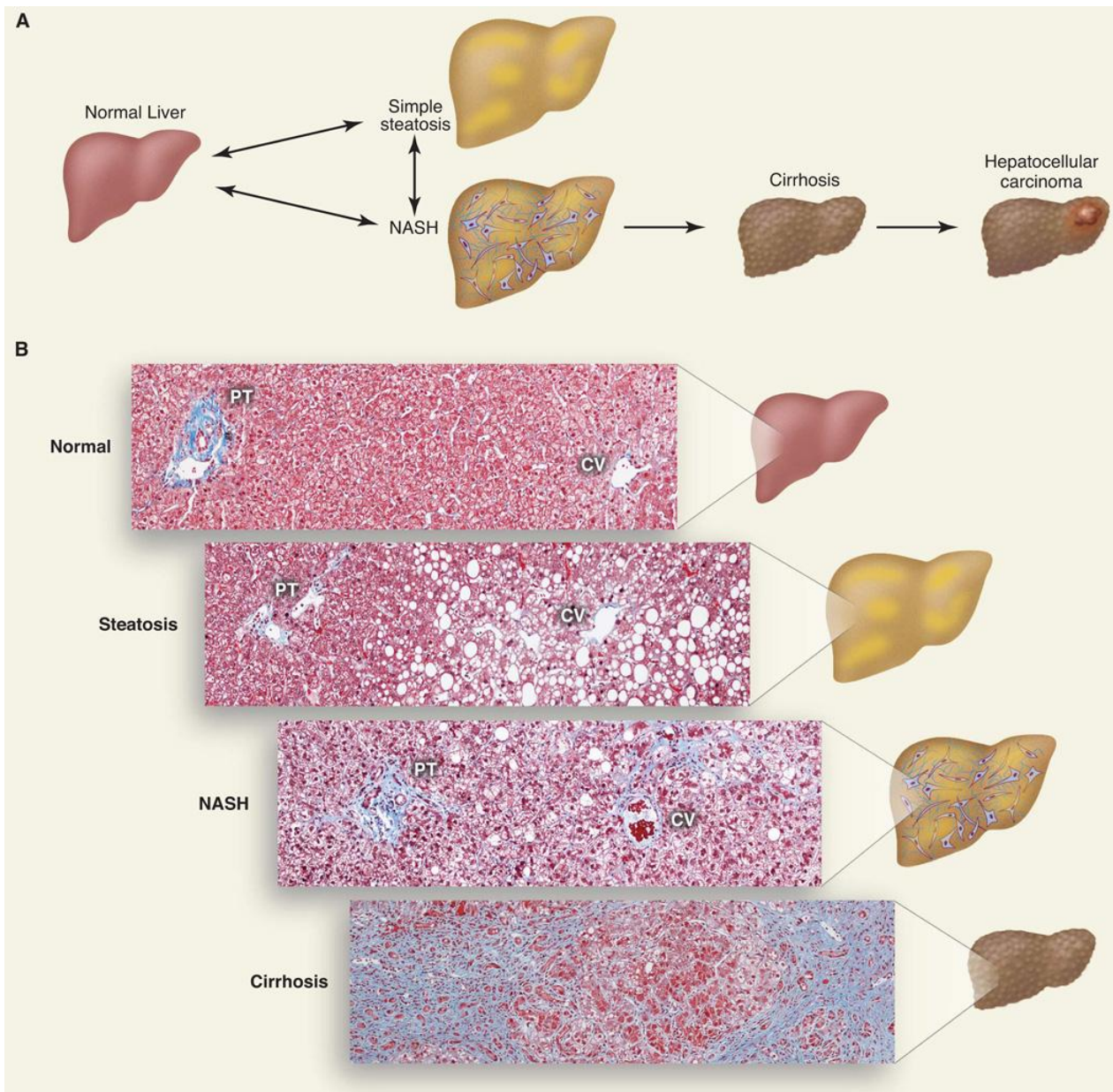


Figure 10 : Spectre de la NAFLD (A) et sections histologiques décrivant un foie normal, une stéatose, une NASH et une cirrhose. Les fibres de collagène sont teintées en bleu avec le trichrome de Masson. CV : veine centrale PT : triade portale (artère hépatique, veine portale et conduit biliaire), schéma issu de Cohen et al., 2011.

### (c) Modèles animaux de stéatose hépatique non alcoolique

Plusieurs modèles animaux de stéatopathies hépatiques non alcooliques sont étudiés dans la littérature. Ces modèles sont obtenus soit par modification génétique (comme les souris *ob/ob* ou *db/db*) soit par induction de l'obésité via l'alimentation chez des souches identifiées de souris. La Table 2 présente quelques exemples de modèles murins de stéatopathies hépatiques non alcooliques.

	Modèle	Symptômes hépatiques	Description du modèle
MODELE GENETIQUE	<b>Souris <i>ob/ob</i></b> <i>Lawrence et al., 2012</i>	Stéatose (une administration de lipopolysaccharide peut provoquer une stéatohépatite)	<ul style="list-style-type: none"> <li>repose sur une invalidation de l'hormone de la satiété (la leptine)</li> <li>inclut les symptômes du syndrome métabolique mais une déficience en leptine est rare chez l'homme</li> </ul>
	<b>Souris <i>db/db</i></b> <i>Kobayashi et al., 2000</i>	Stéatose	<ul style="list-style-type: none"> <li>repose sur une invalidation du récepteur à la leptine</li> <li>inclut les symptômes du syndrome métabolique mais le modèle n'a pas d'évolution vers la fibrose</li> </ul>
	<b>Souris <i>L-G6pc<sup>-/-</sup></i></b> <i>Mutel et al., 2011</i>	Stéatose Adénomes hépatocellulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>repose sur une invalidation du gène <i>G6pc</i> dans le foie</li> </ul>
	<b>Souris <i>IRS1<sup>-/-</sup></i></b> <i>Nakamura et al., 2012</i>	Stéatohépatite Adénomes hépatocellulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>repose sur une invalidation du gène <i>IRS1</i></li> </ul>
REGIME	<b>Souris C57BL6/J soumise à un régime riche en lipides / riches en sucres (saccharose/fructose)</b> <i>Moraes et al., 2003</i> <i>Fraulob et al., 2010</i>	Stéatose	<ul style="list-style-type: none"> <li>présente les symptômes humains d'une stéatose induit très peu d'inflammation ou de fibrose liée à l'obésité</li> </ul>
	<b>Souris soumise à un régime carencé en méthionine-choline</b> <i>Tiniakos et al., 2010</i>	Stéatose Nécroinflammation Fibrose	<ul style="list-style-type: none"> <li>induit une diminution de l'exportation hépatique de lipides</li> <li>histologiquement proche de la stéatohépatite mais régime non disponible chez l'homme</li> </ul>

Table 2 : Exemples de modèles murins de stéatose et/ou de stéatohépatite couramment rencontrés dans la littérature ainsi que le modèle récemment développé par Mutel et al., 2011 qui fait l'objet de l'étude par spectroscopie de résonance magnétique dans ce manuscrit de thèse.

Bien que le rôle des apports alimentaires et des lipides n'interviennent que dans 15 % des triglycérides hépatiques, la composition des régimes perturbe le métabolisme lipidique.

Un régime riche en lipides et en fructoses induit une stéatose et une résistance à l'insuline chez des souris C57BL/6J mais également une surcharge en fer avant que la stéatose et la résistance à l'insuline ne s'installent (Tsuchiya et al., 2013).

Un régime riche en lipides (60% de lipides, 20% protéines et 20% de glucides) enrichi d'un supplément en acides gras polyinsaturés à longues chaînes : l'acide eicosapentaénoïque (Eicosapentaenoic Acid, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (Docosahexaenoic acid, DHA) réduit les effets du stress oxydant dans le foie stéatosique (Valenzuela et al., 2012).

Chez des souris C57BL/6J, l'ajout de palmitoléate (16 :1n7) au régime alimentaire avec un régime faible en calorie induit une stéatose ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Chez les souris sous régime hyperlipidique avec un supplément en palmitoléate, le palmitoléate dissocie la résistance à l'insuline et les réponses inflammatoires de la stéatose hépatique (Guo et al., 2012).

#### 2.4.2 Développement d'adénomes hépatiques chez l'homme

L'adénome hépatique est une tumeur rare, avec une manifestation prédominante chez les femmes jeunes utilisatrices de contraceptifs oraux. Un HCA est une prolifération bénigne d'hépatocytes dans un foie normal. Les HCA se présentent sous forme de nodules, peuvent être uniques ou multiples et présenter des saignements. Lors de leur évolution, les HCA peuvent être stables, augmenter en taille ou régresser. Chez les patients atteints de glycogénose de type 1a, les HCA ont régressé suite à un régime alimentaire strict (Parker et al., 1981). Leur transformation en carcinome hépatocellulaire est rare mais le risque d'une telle transformation est plus élevé chez les patients atteints de glycogénose (Conti and Kemeny, 1992).

Le HCC est le cancer primitif le plus commun du foie. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer du foie représente 695 000 décès par an dans le monde et en France, 5000 à 6000 nouveaux cas par an sont diagnostiqués. Les principaux facteurs de risques pour développer un HCC sont les hépatites chroniques : l'hépatite B, l'hépatite C, la consommation d'alcool et l'hématochromatose. Chez les sujets obèses, le cancer du foie présente le risque le plus élevé que ces sujets pourraient développer (Caldwell et al., 2004). Une étude récente a mis en évidence que les HCC pouvaient survenir autant dans un foie cirrhotique que dans un foie non-cirrhotique (Alexander et al., 2013). En regroupant les études publiées entre 1990 et 2010, sur 169 patients atteints de NAFLD associés à l'hépatocarcinome, Duan et al., 2012 a mis en évidence que 40% des HCC se développaient dans des foies non cirrhotiques.

### (a) Développement des adénomes chez les glycogénoses de type 1

Au niveau moléculaire, les adénomes cellulaires peuvent être généralement classés en trois catégories selon les mutations associées (Bioulac-Sage et al., 2007).

Ainsi, on peut distinguer :

- les adénomes mutés HNF1- $\alpha$  (Hepatocytic Nuclear Factor 1 alpha) qui représentent 30-50% des cas. Ces adénomes sont associés à un foie stéatosique, sans aucune anomalie cytologique ni infiltrat inflammatoire ;
- les adénomes mutés pour le gène  $\beta$ -caténine représentent 10 à 15 % des adénomes. Ces adénomes sont moins associés à un foie stéatosique mais présentent plus souvent des anomalies cytologiques ;
- les adénomes inflammatoires (mutation de la voie STAT3) qui représentent 35 % des adénomes et caractérisés par la présence d'infiltrats inflammatoires et parfois de télangiectasie (dilatation des petits vaisseaux sanguins) ;
- les adénomes qui sont non-mutés pour les gènes  $\beta$ -caténine et HNF1- $\alpha$  et qui ne présentent aucun signe d'inflammation (adénomes non classés).

Une classification des adénomes hépatocellulaires chez les patients atteints de glycogénose de type 1a et de type 1b a été établie par Calderaro et al., 2013 sur un échantillon de 25 biopsies hépatiques .

Les résultats ont montré que 52 % étaient des adénomes inflammatoires, 28 % des adénomes mutés pour le gène  $\beta$ -caténine et 20% étaient des adénomes non classés.

Chez les patients atteints de glycogénose de type I, le développement d'adénomes s'accompagne d'une élévation de la concentration des triglycérides plasmatiques (Wang et al., 2011).

Chez le modèle animal développé par l'équipe de Fabienne RAJAS, les souris *L-G6pc*<sup>-/-</sup> présentent les premiers nodules à 9 mois et toutes les souris de l'étude ont développé des nodules après 18 mois d'inactivation du gène.

### (b) Modèles animaux de cancer hépatique

Les modèles animaux disponibles pour l'étude des hépatocarcinomes peuvent être classés en trois groupes :

- les modèles de souris transgéniques qui expriment des gènes viraux ou des oncogènes ;
- les hépatocarcinomes induits chimiquement par des hépatotoxines dont les symptômes sont rapprochés du cycle inflammation-fibrose-malignité chez l'homme ;
- les modèles xénogreffes, qui sont réalisés en implantant des lignées cellulaires cancéreuses chez la souris. Ces modèles sont surtout utilisés pour le test de certains médicaments.



Parmi les modèles de souris génétiquement modifiés, nous pouvons citer un modèle murin de NASH qui développe spontanément des tumeurs hépatiques. Ce modèle a été étudié, afin d'évaluer le rôle de la stéatose dans le développement de la NASH et de la tumorigenèse (Nakamura et al., 2012). Chez ce modèle, le gène insulinerécepteur substrate (IRS 1) a été invalidé (*Irs1*<sup>-/-</sup>). L'IRS 1 joue un rôle de médiateur des effets mitogénétique et métabolique de l'insuline dans les tissus périphériques ainsi qu'un rôle de régulation dans la sécrétion de l'insuline (Sesti et al., 2001). Ce modèle présente une faible sécrétion d'insuline et est faiblement insulino-résistant (Kubota et al., 2000). Une surexpression de ce médiateur entraîne chez les souris jeunes une prolifération hépatocellulaire (Mohr et al., 2008).

Ce modèle de souris a été soumis à un régime riche en lipides pendant 60 semaines. Ces souris ont développé une résistance à l'insuline très importante ainsi qu'une hyperglycémie post-prandiale. Cependant, les analyses histologiques de leur foie ont révélé un foie presque normal et une faible proportion de stigmates de la NASH. Deux études complémentaires ont également été réalisées chez des souris C57Bl/6J par la même équipe. Parmi elles, l'influence à long terme d'un régime alimentaire riche en lipides est évaluée par rapport à un régime standard chez des souris C57Bl/6J. Après 60 semaines de nourritures riches en lipides, le foie de ces souris a montré des marqueurs d'inflammation de la NASH ainsi que des traces de fibrose. 54% de ces souris présentaient des lésions nodulaires à la surface de leur foie.

Sur un autre groupe de souris C57Bl/6J, un changement de régime a été opéré au bout de 30 semaines. Les souris initialement nourries avec un régime riche en lipides ont ensuite été nourries avec un régime standard. Le changement d'un régime hyperlipidique à un régime standard a réduit la survenue de nodules de 65% à 15% comparé au groupe qui n'avait pas eu de changement de régime, de même qu'une baisse significative des marqueurs d'inflammation de la NASH.

Ainsi, cette étude a démontré qu'une alimentation hyperlipidique prolongée génère les stigmates de la NASH ainsi qu'une tumorigenèse.

Parmi les modèles animaux d'HCC dues aux hépatotoxines, signalons le modèle intoxiqué au tétrachlorométhane ou tétrachlorure de carbone (Carbon tetrachloride CCl<sub>4</sub>). Ce modèle développe une fibrose puis un hépatocarcinome au bout de 104 semaines (Heindryckx et al., 2009).

Cette première partie a permis de présenter les mécanismes biologiques à l'origine de l'installation d'une stéatose du foie mais également les symptômes qui caractérisent la glycogénose de type 1a.

## **B. Contexte technique**

Dans cette partie, la spectroscopie de résonance magnétique (SRM) ainsi que les autres techniques utilisées dans cette thèse sont brièvement présentées. La SRM qui peut être appliquée *in vivo* ou sur des solutions en haute résolution est contextualisée au regard des principales techniques permettant de quantifier ou de caractériser les triglycérides du foie.

Après une présentation générale des lipides permettant d'introduire des notions et définitions utiles, les principales techniques de quantification de la stéatose sont décrites. Puis est abordée la caractérisation de la composition lipide, via la SRM et la chromatographie en phase gazeuse. Enfin, une revue des travaux, utilisant la technique de SRM *in vivo* pour l'étude de la stéatose hépatique et des cancers hépatiques est faite.

### **1. Les lipides**

Les lipides sont des molécules organiques essentielles à notre métabolisme. Ce sont des molécules insolubles dans l'eau (ou très faiblement solubles), mais solubles dans les solvants organiques non polaires comme l'éther, le chloroforme, le méthanol ou le cyclohexane. Selon leur structure, ils sont définis comme des lipides simples ou complexes.

#### **1.1 Lipides simples**

##### **1.1.1 Acides gras**

Les acides gras sont des acides aliphatiques R-COOH avec un nombre pair de carbones ou un acide carboxylique avec une longue chaîne hydrocarbonée. Le nombre de carbone varie de 2 à 38 mais dans la nature, un nombre compris entre 16 ou 18 est plus fréquent.

Nous pouvons distinguer :

- Les acides gras à chaîne longue : pour un nombre de carbones compris entre 14 et 24 ;
- Les acides gras à chaîne moyenne : pour un nombre de carbone compris entre 6 et 12 ;
- Les acides gras à chaîne courte : pour un nombre de carbone compris entre 1 et 4.

Un acide gras peut être estérifié par un alcool (glycérol) et former un ester d'alcool.

Différentes nomenclatures existent pour la classification des acides gras. Elle peut être définie :

- en numérotant le carbone du groupe carboxylique par 1 ;
- ou en nommant le carbone le plus oxydé, donc le plus proche du groupe carboxylique, par  $\alpha$  puis ainsi de suite  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , le dernier carbone est toujours noté  $\omega$ . Cette nomenclature est utilisée pour signaler la présence de double liaison à partir de ce carbone  $\omega$ , par exemple la famille des  $\omega 3$  où la première double liaison est située au niveau du troisième carbone.

L'acide gras peut être noté par son nombre de carbones ainsi que le nombre de doubles liaisons qu'il comporte : « C16 : 0 » représente un acide gras composé de 16 atomes de carbone et aucune (« 0 ») double liaison.

#### (a) Acides gras saturés

Les acides gras saturés ne comportent aucune double liaison dans leurs chaînes hydrocarbonées. La Table 3 présente des exemples d'acides gras saturés à longue chaîne.

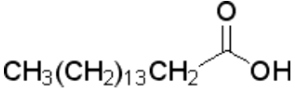
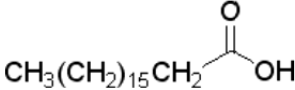
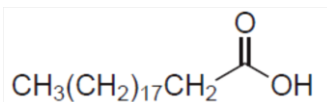
Dénomination	Formule/Nom systématique	Structure
Acide palmitique	C16 :0 Acide hexadécanoïque	
Acide stéarique	C18 :0 Acide octadécanoïque	
Acide arachidique	C20 :0 Acide icosanoïque	

Table 3 : Exemples d'acides gras saturés.

#### (b) Acides gras insaturés

Les acides gras insaturés comportent au moins une double liaison (mono insaturés) ou plusieurs doubles liaisons (polyinsaturés). Des exemples d'acides gras insaturés sont présentés dans Table 4. Les acides gras linoléique et de l'acide  $\alpha$ -linoléique sont dits «essentiels» car ils ne peuvent être synthétisés par l'organisme mais doivent être apportés par l'alimentation. La composition de notre régime alimentaire donc influe directement sur la composition des acides gras dans notre corps.

Dénomination	Formule/ Nom systématique	Structure
Acide oléique	C18 :1(n-9) acide 9-octadécénoïque	
Acide linoléique	C18 :2 (n-6) acide 9,12-octadécadiénoïque	
Acide α-linolénique	C18 :3 (n-3) acide 9, 12, 15 octadécatriénoïque	

Table 4 : Exemples d'acides gras insaturés

### 1.1.2 Les acyls glycérols/glycérides

Ce sont des esters d'acides gras. Selon le nombre d'acides gras estérifiés, nous avons les monoacylglycérols (monoglycérides), les diacylglycérols (diglycérides), les triacylglycérols (triglycérides). Les triglycérides sont les molécules de stockage de l'énergie chez les animaux. Les triglycérides sont constitués d'une molécule de glycérol et de trois acides gras (voir Figure 17 b).

La Table 5 représente quelques exemples de glycérides.

Dénomination	Structure
Glyceryl 1,3 dipalmitate	
Glyceryl tristearate	
Glyceryl trioleate	

Table 5 : Exemples de glycérides

## 1.2 Lipides complexes

Les lipides complexes ou hétérolipides sont des lipides simples liés à des groupes phosphate, sulfate ou glucidique.

### 1.2.1 Phospholipides

Les phospholipides sont les lipides constitutifs des membranes cellulaires. Parmi les phospholipides, nous pouvons citer :

- La phosphatidylcholine (lécithine) : elle est le phospholipide membranaire le plus abondant (couche externe de la membrane cellulaire). Elle constitue une réserve de choline et de groupements méthyles ;
- La phosphatidyléthanolamine (céphaline) : abondant dans la couche interne des membranes cellulaires ;
- La phosphatidylsérine est présente dans les tissus nerveux ;
- La phosphatidylinositol qui est un phospholipide important du cerveau.

Nom	Structure
Phosphatidylcholine	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{CH} \\    \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\    \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1  \end{array}  $
Phosphatidyléthanolamine	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{CH} \\    \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+ \\    \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1  \end{array}  $
Phosphatidylsérine	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{CH} \\    \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{COO}^-) \\    \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1  \end{array}  $
Cardiolipide diphosphatidylglycérol, DPG	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{CH} \\    \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2 \\    \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CH}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2 \\    \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_3 \\    \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CH}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_4  \end{array}  $

Table 6 : Quelques exemples de phospholipides

### 1.2.2 Cholestérol

Le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdes ainsi que des acides biliaires.

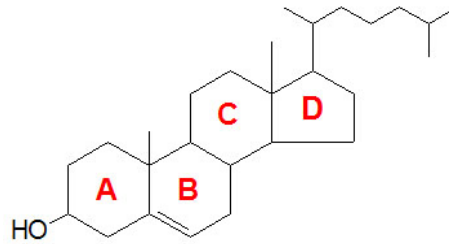


Figure 11 : Structure du cholestérol où A, B, C et D sont des noyaux cyclo-pentano phénanthréniques.

### 1.2.3 Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des acides complexes où les acides gras sont liés par des liaisons peptidiques (ou amide : un atome d'azote lié à son groupement carbonyle) à une sphingosine. Une sphingosine est un alcool d'amide avec une double liaison.

Exemple : la sphingomyéline, qui est à la fois un sphingolipide et un phospholipide.

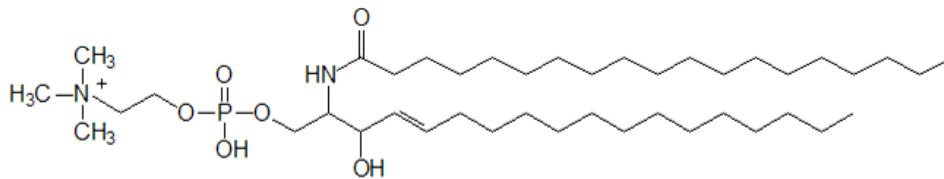


Figure 12 : Structure de la sphingomyéline.

## 2. Techniques de détection et de quantification de la stéatose

Les techniques de détection et de quantification de la stéatose sont présentées dans cette partie. Bien que l'examen de routine soit encore la biopsie hépatique, son caractère invasif ont conduit aux développements de techniques non invasives/moins invasives fondées sur les grandes modalités d'imagerie : l'ultrasonographie (échographie abdominale), la tomodensitométrie par rayons X, l'imagerie et la spectroscopie de résonance magnétique.

### 2.1 L'histologie, technique de référence

Le diagnostic de la stéatose se fait en routine clinique par la lecture de lames histologiques, obtenues à la suite d'une biopsie du foie. La biopsie est réalisée à l'aide d'une échographie abdominale. Une aiguille est insérée via l'espace intercostale pour atteindre le foie et recueillir 15 mm de tissu hépatique environ. Les prélèvements sont ensuite fixés dans le formaldéhyde, inclus en paraffine puis les coupes sont colorées à

l'Hématéine-Eosine-Safran (HES). Puis les lames sont lues par un anatomopathologiste. Bien que cette technique soit la technique de référence, plusieurs inconvénients sont présents. D'une part, seule une petite portion du foie est recueillie, ce qui peut induire des faux négatifs (Ratziu et al., 2005) et d'autre part, cette technique reste invasive. A noter que d'autres techniques complémentaires sont pratiquées pour élaborer le diagnostic. Ces techniques sont les techniques de dosages plasmatiques et les techniques d'imagerie.

## 2.2 Les dosages lipidiques

Les triglycérides peuvent être dosés soit à partir du plasma soit à partir du foie. Pour le cas du foie, une homogénéisation complète du foie est nécessaire.

### 2.2.1 Principe

Deux principales techniques sont utilisées pour l'extraction des lipides dans les tissus. La méthode de Folch (Folch et al., 1957) utilise un mélange de chloroforme-méthanol (2 :1) pour homogénéiser le tissu, afin d'avoir un volume final solvant-tissu de 20 :1 (1g dans 20 ml de mélange de solvants) . Puis le tout est agité pendant 15-20 min. L'extrait est ensuite filtré ou centrifugé. Le solvant (la phase organique) est ensuite lavé avec de l'eau ou du chlorure de sodium (NaCl) à 9% pour être purifié. Le mélange est à nouveau centrifugé à une faible vitesse (2000 tours par minute) pendant environ dix minutes. Les lipides se trouvent dans la partie inférieure (la phase inférieure du chloroforme). La méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959) utilise le mélange de chloroforme-méthanol (1 :1) dans un mélange de solvant-tissu de 2:1.

Les dosages sont réalisés grâce à des kits enzymatiques commerciaux par exemple Boehringer® Mannheim Triglyceride qui utilise le glycérol phosphate oxydase ou Wako®L-Type TGH qui utilise le N-(3-sulfopropyl)-3-methoxy-5-methylaniline (HMMPS) comme révélateur. Le taux des triglycérides hépatiques est exprimé en mg/g de protéines et le taux de triglycérides plasmatiques est exprimé en g/L.

Chez l'homme ainsi que chez le petit animal, les triglycérides plasmatiques et hépatiques parfois le cholestérol, sont dosés. Ces dosages sont souvent corrélés avec les mesures de SRM notamment pour la quantité lipidique (Garbow et al., 2004, Szczepaniak et al., 2005).

## 2.3 Les techniques d'imagerie

### 2.3.1 L'échographie abdominale

Facilement accessible et non ionisante, l'échographie abdominale est très utilisée pour le diagnostic des maladies stéatosiques. L'échographie détecte un changement d'échogénicité du tissu hépatique par rapport au rein ou à la rate. L'échographie hépatique permet la détection de la stéatose avec une bonne sensibilité (83%) et une très bonne spécificité (~100%) (Sanyal, 2002). Cependant, l'échographie est une

technique d'imagerie très dépendante de la qualité de la formation de l'opérateur et sa sensibilité est relative, surtout pour des sujets très obèses (Ali and Cusi, 2009) ; elle est mauvaise pour les stéatoses modérées. Ainsi elle permet de détecter la stéatose mais pas de la quantifier. De plus, l'échographie ne peut prédire la fibrose.

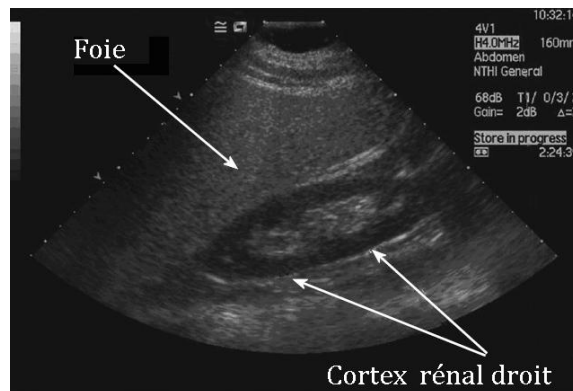


Figure 13 : Image ultrasonore d'un foie stéatosique. Le foie stéatosique apparaît hyperéchogène comparé au cortex rénal droit. Image tirée de Mehta et al., 2008.

### 2.3.2 La tomодensitométrie ou le scanner

La tomодensitométrie mesure l'atténuation d'un faisceau de rayons X par les tissus mous grâce à la détection de ces rayons, appliqués circulairement. La quantification de la graisse se fait en comparant les atténuations entre le parenchyme hépatique comparé aux vaisseaux intra hépatiques, au pancréas et aux reins en unités de Hounsfield. Cette technique ne distingue qu'une stéatose modérée à sévère, et ne permet pas de distinguer la NASH, mais expose également le patient à des radiations.

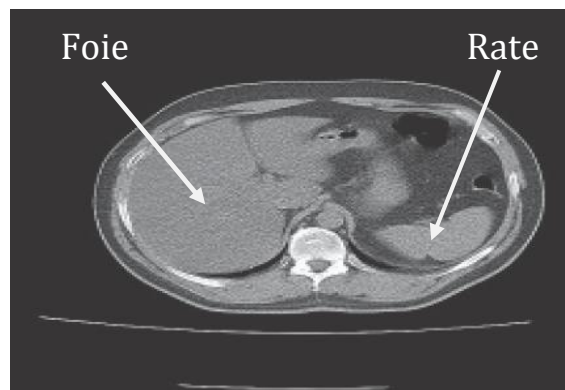


Figure 14 : Coupe axiale d'un foie stéatosique en tomодensitométrie non contrastée : la stéatose apparaît plus sombre que la rate. Image tirée de Mehta et al., 2008.

L'échographie abdominale et la tomодensitométrie sont des techniques plutôt « qualitatives » car elles ne permettent pas de quantifier de manière précise la graisse hépatique et ne sont pas utilisées pour le suivi des patients lors d'un traitement ou au cours de la progression de la maladie.



### 2.3.3 Les techniques de résonance magnétique

L'IRM et la SRM sont fondées sur le phénomène de résonance magnétique, mis en évidence en 1945, par deux groupes de physiciens, Purcell (Harvard) et Bloch (Stanford) (prix Nobel 1952). Ce phénomène repose sur les propriétés magnétiques de certains noyaux, dont l'aimantation macroscopique résultante est modifiée sous l'action de champs magnétiques. Cette propriété magnétique est caractérisée par le spin de l'atome représentant le moment cinétique intrinsèque. Ainsi un noyau est observable par RMN s'il possède un spin demi-entier. Les atomes observables et les plus étudiées en SRM sont l'hydrogène  $^1\text{H}$ , le carbone  $^{13}\text{C}$ , le fluor  $^{19}\text{F}$ , l'azote  $^{15}\text{N}$  et le phosphore  $^{31}\text{P}$ . *In vivo*, l'hydrogène présente les applications les plus nombreuses puisque sa sensibilité est très élevée. Les techniques basées sur le phénomène de la résonance magnétique sont largement utilisées dans le cadre de la quantification de la graisse. Pour déterminer le contenu lipidique dans le foie, ces techniques exploitent le fait que les déplacements chimiques des protons de l'eau et des protons associés aux triglycérides sont clairement distincts. Leurs contributions relatives peuvent être quantifiées (par imagerie ou par spectroscopie, selon plusieurs précautions) car l'intensité de leurs signaux est directement proportionnelle à leurs concentrations.

La SRM est la première application exploitant le phénomène de résonance magnétique. Elle est vite devenue, dès 1960, une méthode d'analyse puissante, utilisée en chimie, pour obtenir des renseignements sur la structure d'une molécule (voir 3.1.1). La SRM *in vivo* fait son apparition au début des années 80 et devient un sujet de recherche d'intérêt pour l'exploration du vivant puisque cette technique non-invasive permet l'étude *in vivo* du métabolisme (i.e synthèse ou dégradation de substances organiques) ainsi que de la biochimie cellulaire. Son caractère non invasif permet le suivi longitudinal de l'évolution d'une pathologie ou le suivi de l'impact thérapeutique d'un médicament.

#### (a) Origines cellulaires des lipides en RMN *in vivo*

Les lipides sont très présents dans les cellules : les phospholipides qui constituent les membranes cellulaires, les lipides neutres (triglycérides et cholestérol ester) présents dans le cytoplasme. En RMN, seules les molécules mobiles sont détectables. La conformation des lipides constituant les membranes ne leur confèrent pratiquement pas de mobilité. Seuls les lipides neutres et particulièrement les **triglycérides intracellulaires** peuvent être détectés. Le cholestérol n'est visible qu'à des temps d'écho très très courts, de l'ordre de 3ms (Liimatainen et al., 2006). Cependant, dans les processus de mort cellulaire ou chez les cellules tumorales, les membranes cellulaires perdent une partie de leurs acides gras insaturés. Cette perte est corrélée avec l'augmentation de la proportion de la double liaison par imagerie spectroscopique (Liimatainen et al., 2008).

(b) Imagerie par résonance magnétique pour la quantification de la stéatose

En ce qui concerne l'imagerie par résonance magnétique, diverses séquences existent et reposent sur la différence de fréquence de résonance entre l'eau et la graisse. Une séquence simple exploitant cette propriété est la séquence en phase et en opposition de phase (IP/OP) qui est une séquence d'écho de gradient acquise à deux temps d'écho (TE), où les signaux de l'eau et de la graisse sont en phase (IP) et en opposition de phase(OP)(Figure 15).

Les temps d'écho (TE) sont choisis plus courts que le temps de relaxation transversal apparent T2\* du foie. L'image en phase est donc la somme des signaux de l'eau et de la graisse, tandis que l'image en opposition de phase est la différence entre les signaux de l'eau et de la graisse. C'est la technique classique dite de Dixon. La quantification de la graisse faite par imagerie corrèle bien avec les mesures faites par spectroscopie de résonance magnétique (Reeder et al., 2011) et l'histologie (Hines et al., 2012). ). Pourtant, une quantification reproductible et fiable fait toujours l'objet de recherches actives en raison des multiples paramètres intrinsèques et extrinsèques pouvant affecter l'estimation. La séquence IP/OP a dû être améliorée pour prendre en compte les effets des temps de relaxation et en modélisant la graisse en plusieurs compartiments (Reeder et al., 2009). Ainsi, une séquence d'imagerie 3D appelée « IDEAL » (Iterative Decomposition with Echo Asymmetry and Least squares estimation), a été plus récemment proposée ( Reeder et al., 2007).

Nous avons constaté que, malgré un nombre encore limité d'études, la spectrométrie par résonance magnétique (SRM) proton ( $^1\text{H}$ ) est considérée comme **la méthode de référence pour évaluer *in vivo* le contenu en triglycérides hépatiques et diagnostiquer la stéatose hépatique**. Nous présentons dans le paragraphe suivant les grands contours de cette technique qui peut être appliquée *in vivo* ou *ex vivo*.

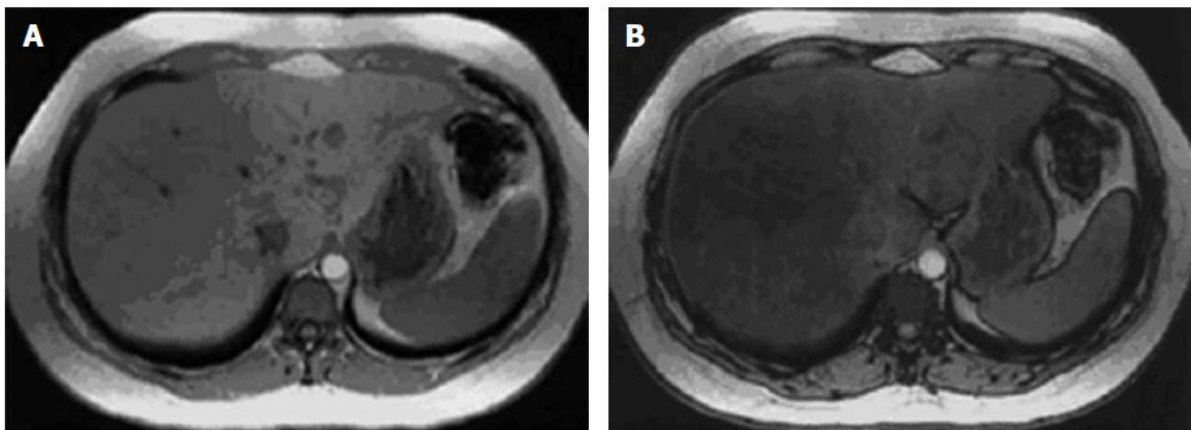


Figure 15 : Coupe axiale du foie chez un patient avec une stéatose sévère : une diminution du signal apparaît d'une image en phase (A) par rapport à une image en opposition de phase (B). Image tirée de Mehta et al., 2008.

L'élastographie par imagerie de résonance magnétique est une nouvelle technique émergente qui permet d'apprécier la viscosité et l'élasticité d'un tissu, grâce à la propagation d'ondes mécaniques à basse fréquence. Elle est plébiscitée pour l'étude de la fibrose (Rustogi et al., 2011).

### (c) La spectroscopie de résonance magnétique

Si la spectroscopie proton sur le cerveau est de loin l'application la plus fréquente, d'autres organes peuvent être étudiés par SRM ; par exemple le sein, le muscles, la prostate, ou encore le foie, comme dans le cadre de cette thèse. La principale limitation de la SRM *in vivo* est sa faible sensibilité (i.e rapport signal sur bruit par unité de temps d'acquisition). Cependant, les développements récents en instrumentation et en optimisation des méthodes d'acquisition -permettant notamment la localisation du signal- ainsi que l'utilisation de champ magnétique statique de plus en plus intenses ont permis de détecter des concentrations inférieurs à 1mM dans le cerveau humain avec une grande spécificité spatiale (Terpstra et al., 2006). En effet, la spectroscopie *in vivo* a d'abord été « non localisée », le signal de spectroscopie étant recueilli par des antennes de surface et la région observée par SRM étant la région de sensibilité de l'antenne. A présent des séquences de localisation monovoxel (un volume de sélection) et multi-voxel (imagerie spectroscopique) sont utilisés. L'analyse de ce signal 1D permet de remonter, de façon quantitative, aux proportions (ou concentrations) des molécules ou groupements chimiques qui résonnent et sont caractérisés par leurs déplacements chimiques (fréquence) et leurs couplages scalaires J (i.e interaction magnétique entre spins transportés par les électrons de liaisons).

Chez l'homme, les champs cliniques utilisés sont les champs à 1,5 T et à 3T. Chez le petit animal, les champs sont au-delà (4,7T, 7T, 9,4T, 11,7T). La mise en œuvre de la spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (RMN) monovoxel *in vivo* pour l'étude des lipides du foie de souris fait l'objet des développements méthodologique de cette thèse. Ainsi les séquences de localisation (STEAM et PRESS) généralement utilisées pour les études *in vivo*, et les traitements du signal nécessaires à la quantification des lipides seront détaillées au chapitre II.

La plupart des études de spectroscopie proton du foie de 1995 à 2005 ont porté sur l'évaluation de la quantité de triglycérides via la mesures des contributions du groupe méthyle (-CH<sub>3</sub> résonant à 0,9ppm) et méthylène (-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- résonant à 1,3ppm) sur un spectre de foie.

## 3. Caractérisation et Analyse des lipides

### 3.1 Par spectroscopie de résonance magnétique

La spectroscopie de résonance magnétique (SRM) peut s'appliquer dans divers cadres : *in vivo*, en haute résolution sur des solutions ou préparations liquides, en haute résolution sur des échantillons *ex vivo* (e.g analyse haute résolution à l'angle magique de

biopsie). Chacune de ces applications constituent des domaines de recherche distincts, mais qui possèdent de forts recouvrements méthodologiques. Les développements ou études en SRM haute résolution pour l'analyse des lipides ou à l'angle magique enrichissent les potentialités de la SRM *in vivo*. Ainsi comme nous allons l'exploiter dans cette thèse, la SRM ne sera plus simplement utilisée pour quantifier la stéatose mais aussi pour caractériser la composition des lipides du foie.

### 3.1.1 La spectroscopie à haute résolution

La spectroscopie haute résolution se fait à des champs élevés, généralement supérieur à 300 MHz (>7T), sur des échantillons *ex vivo* ou *in vitro*, placés dans un tube fin. Dans le cas des lipides, ceux-ci sont mis en solution dans le CDCL<sub>3</sub>, le chloroforme deutéré. *In vitro*, cette technique est appliquée pour déterminer la structure des acides gras simples. Quelques spectres d'acides gras simples sont présentés en Figure 16.

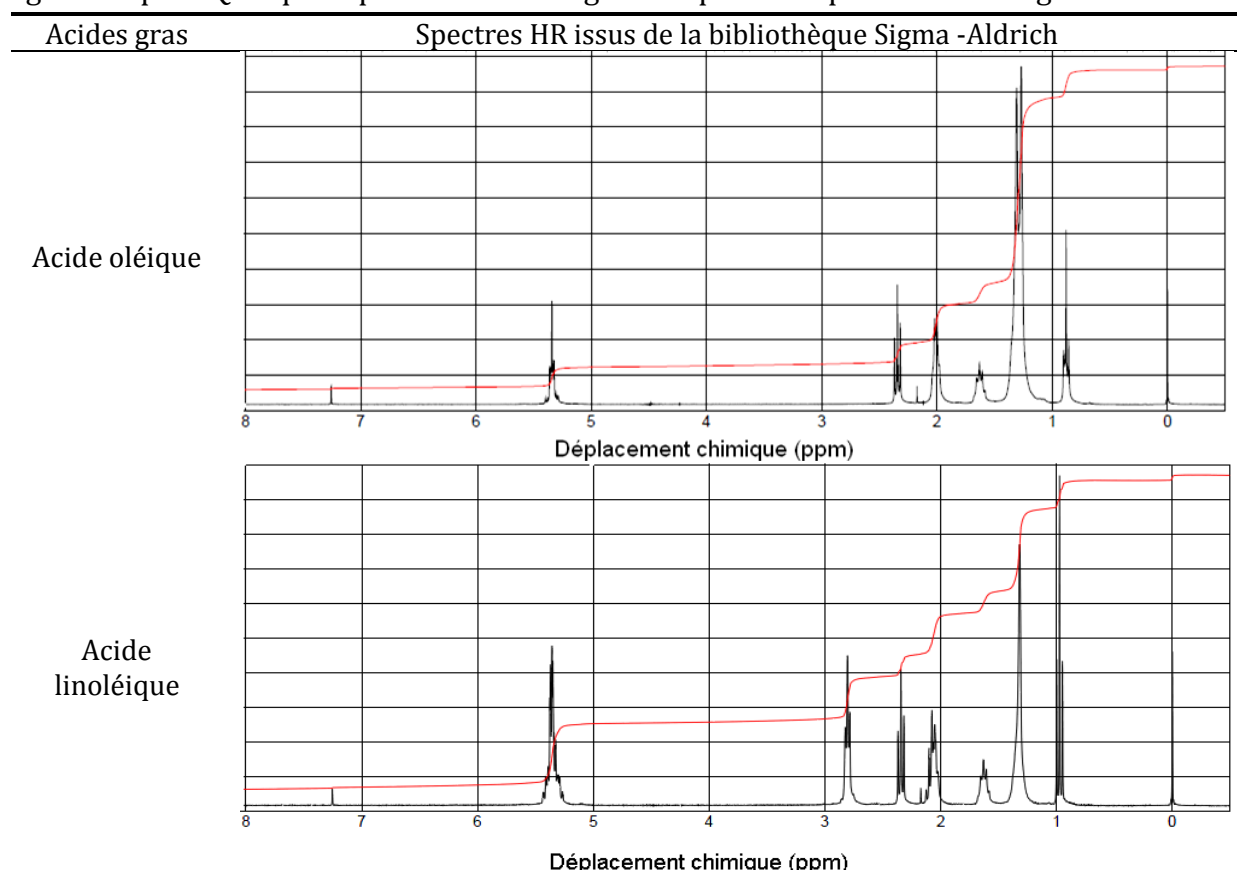


Figure 16 : Spectres Haute Résolution de l'acide oléique avec six groupes de résonances et de l'acide linoléique avec sept groupes de résonances dans la zone [0,8-6 ppm] qui correspondent aux résonances lipidiques, le pic à 7,3 ppm est la résonance du chloroforme et celui à 0 ppm est le pic du TMS (Tetramethylsilane).

La spectroscopie à haute résolution a été utilisée pour l'analyse de tissu adipeux chez le rat (Zancanaro et al., 1994), après extraction des lipides selon la méthode de Folch et dissolution dans du chloroforme deutéré, voir Figure 17.

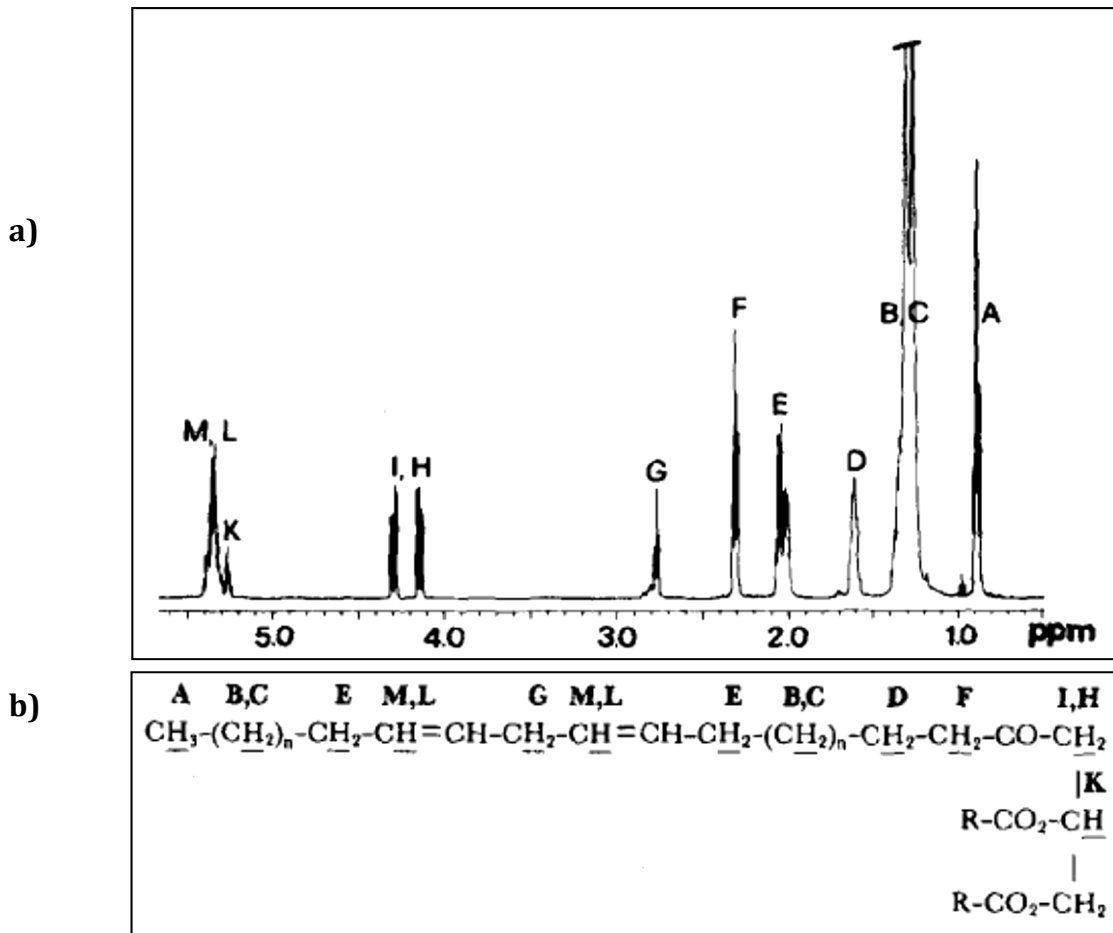


Figure 17 :a) Spectre  $^1\text{H}$  RM de l'extrait de tissu adipeux à 500Mhz (11.75T). Spectre repris de (Zancanaro et al., 1994), les résonances sont assignées aux protons des chaînes des acides gras et du glycérol, compris dans la structure chimique des triglycérides, comme affiché en b).

Comme la spectroscopie de résonance magnétique permet une analyse sans extraction ni séparation des lipides, elle est notamment très utilisée en chimie alimentaire, par exemple pour l'analyse des huiles d'olive pour en connaître la qualité (Sacchi et al., 1997; Fauhl et al., 2000; Guillen and Ruiz, 2003) mais également pour l'étude des structures des différents groupements qui constituent chacun des échantillons (Guillen et al., 2008). Cette technique permet de déterminer le degré d'insaturation (Miyake et al., 1998) mais également la proportion de certains groupements acyles dans la composition de l'huile de foie de morue (Barison et al., ; Guillen and Ruiz, 2001).

### 3.1.2 Les indices lipidiques dérivés des acquisitions par SRM

Différents indices ont été définis dans la littérature pour estimer la quantité lipidique, les fractions d'insaturation et de polyinsaturation moyenne (Table 8), à partir des résonances issus des triglycérides (Table 7 et Figure 17 ).

Groupement chimique	Déplacement chimique (ppm)	Description	Nombre de protons
$-\text{CH}_3$	0,9	Méthyl	3
$-(\text{CH}_2)_n-$	1,3	Méthylène	2*n
$\text{F} : -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$	1,6	$\beta$ -methylene au groupement carboxyle	2
$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$	2,00	Allylique	4
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	2,25	$\alpha$ -methylene au groupement carboxyle	2
$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	2,8	diallylique ( polyinsaturé)	2
$-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R}$	4	glycérol	1
$-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R}$	4,29	glycérol	1
$-\text{CH}-\text{COO}-\text{R}$	5,2	glycérol	1
$-\text{CH}=\text{CH}-$	5,3	oléfinique	2

Table 7 : Groupements chimiques constitutifs d'une chaîne lipidique et déplacements chimiques associés observés par spectroscopie de résonance magnétique.

Les résonances associées à une insaturation sont les groupements allylique (2 ppm), biallylique (2,8 ppm) et oléfinique (5,3 ppm). Pour les molécules de triglycérides, trois résonances apparaissent respectivement à 4 ppm, 4,29 ppm et 5,2 ppm. Ces résonances constituent le squelette des glycérols. La résonance associée au groupement  $\alpha$ -methylene au groupement carboxyle présente généralement un déplacement chimique à 2,25 ppm. Cette résonance est déplacée à 2,32 ppm pour le trioléate comme l'indique la base de données « Spectral Database for Organic Compounds » SDBS, 1997.

Dans la suite de ce manuscrit, l'intensité d'une résonance de déplacement chimique (dep. chim.) est représentée par 'dep. chim.'. Ainsi '5,3' représente l'intensité de la résonance de déplacement chimique 5,3ppm. *In vivo*, les résonances à 5,2 ppm et 5,3 ppm ne sont pas suffisamment résolues et sont considérées comme un seul massif.

Auteur	Quantité lipidique	Indice de saturation	Indice d'insaturation	Indice de polyinsaturation
Corbin et al., 2009	$\frac{1,3'}{1,3'+4,7'}$	$\frac{3 \ 1,3'}{2 \ 0,9'}$	$\frac{3 \ 5,3'}{2 \ 0,9'}$ $\frac{3 \ 2'}{4 \ 0,9'}$	$\frac{3 \ 2,8'}{2 \ 0,9'}$
Orlacchio et al., 2008	$\frac{1,3+0,9'}{4,7'}$			
Strobel et al., 2008		$1 - \left( \frac{1 \ 2'}{2 \ 2,25'} \right)$	$\frac{1 \ 2'}{2 \ 2,25'}$	$\frac{2,8'}{2,25'}$
d'Assignies et al., 2009	$\frac{2'+1,3'+0,9'}{2'+1,3'+0,9'+4,7'}$			
Cobbold et al., 2009	$\frac{1,3'+0,9'}{4,7'+1,3'+0,9'}$	$1 - \frac{2'+2,8'}{2'+2,8'+1,3'+0,9'}$		$\frac{2,8'}{2,8'+2'+1,3'+0,9'}$
van Werven et al., 2012	$\frac{1,3'}{1,3'+4,7'}$		$\frac{5,3'}{1,3'+4,7'} \frac{5,3'}{1,3'}$	$\frac{2,8'}{1,3'+4,7'} \frac{2,8'}{1,3'}$
van Werven et al., 2010	$\frac{1,3'}{1,3'+4,7'}$		$\frac{5,3'}{5,3'+4,7'}$	

Table 8 : Définitions d'indices lipidiques (quantité lipidique, indices de saturation, d'insaturation et de polyinsaturation) collectés dans la littérature.

Certains de ces indices ont été sélectionnés pour notre étude *in vivo* présentée au chapitre III (Table 9).

- La **quantité lipidique** dans le voxel d'intérêt est le rapport entre la quantité de protons qui intervient dans les groupements méthyle et méthylène des chaînes lipidiques et celle de l'eau.
- **L'indice de saturation** est défini comme le rapport entre les protons des groupements méthylène et méthyle (Corbin et al., 2009). La résonance attribuée au groupement méthylène est la plus intense, le groupement méthyle se trouve en terminaison d'une chaîne lipidique.

*Cet indice reflète de manière indirecte la saturation des chaînes d'acides gras.*

- L'insaturation peut être estimée ou caractérisée selon plusieurs indices correspondant soit aux taux moyens d'acides gras insaturés par chaîne lipidique soit au nombre moyen de doubles liaisons par chaîne lipidique.

- **La fraction d'insaturation** représente le rapport entre le groupement allylique, proche d'une unique double liaison et le groupement  $\alpha$ -méthylène au groupement carboxyle.

- **L'indice d'insaturation totale des acides gras** est donné par le rapport entre les protons du groupement allylique, proche d'une unique double liaison et ceux du méthyle. Il donne la contribution des méthylène protons proches d'une unique double liaison ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$ ). Ce schéma apparaît deux fois dans tous les acides gras insaturés, indépendamment de leur degré d'insaturation. (Corbin et al., 2009)

*Ces deux indices sont équivalents et augmentent avec le nombre d'acides gras insaturés. Dans notre étude, ces deux indices sont conservés afin de pouvoir les comparer avec la littérature.*

- **L'insaturation totale des chaînes** est donnée par le rapport entre les protons du groupement oléfinique et ceux du méthyle. Le groupement oléfinique, qui est associé à la double liaison, est observé en cas de mono insaturation et de polyinsaturation. (Corbin et al., 2009)

*Cet indice traduit le nombre moyen de doubles liaisons par chaîne.*

- **L'insaturation totale** est le rapport entre les protons du groupe oléfinique rapporté aux protons de l'eau et du groupement méthylène, qui est considéré comme le groupement lipidique le plus important. (van Werven et al., 2012)

*Cet indice augmente avec le nombre de doubles liaisons et de lipides insaturés.*

Lors de la définition des indices lipidiques, les résonances '2,25' ppm et '0,9' ppm servent d'éléments de normalisation puisque ces résonances sont présentes sur tous les acides gras.



Indice lipidique	Dénomination	Expression
Quantité lipidique		$\frac{1,3 + 0,9}{4,7 + 1,3 + 0,9}$
Indice de saturation		$\frac{3 \cdot 1,3}{2 \cdot 0,9}$
	Fraction d'insaturation (FI)	$\frac{1 \cdot 2}{2 \cdot 2,25}$
Indice d'insaturation	Indice d'insaturation totale des acides gras (IIAG)	$\frac{3 \cdot 2}{4 \cdot 0,9}$
	Indice d'insaturation totale des chaînes (IITC)	$\frac{3 \cdot 5,3}{2 \cdot 0,9}$
	Insaturation totale (IT)	$\frac{5,3}{1,3 + 4,7}$

Table 9 : Expressions de la quantité lipidique et des indices de saturation et d'insaturation en fonction des intensités des résonances lipidiques et de l'eau.

### 3.2 La chromatographie gazeuse (Gas chromatography, GC)

#### 3.2.1 Principe

La chromatographie gazeuse est une technique de séparation qui implique une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse (Tranchant, 1996). Selon la nature de la phase stationnaire (liquide ou solide), on peut distinguer respectivement la chromatographie gaz-liquide et la chromatographie gaz-solide. Le mécanisme de séparation de la chromatographie gaz-liquide repose sur le principe du partage (partition) tandis que celui de la chromatographie gaz-solide repose sur l'adsorption.

Nous nous intéresserons au cas de la chromatographie gaz-liquide, dont l'appareillage est décrit à la Figure 18.

Il se compose généralement :

- de la chambre d'injection : qui permet la vaporisation de l'échantillon, car elle est chauffée à 150-250°C. L'injection peut être manuelle grâce à une seringue ou automatique grâce à des vannes d'injection.
- d'une colonne (capillaire ou remplie) qui permet la séparation des différents composants selon leur affinité avec la phase stationnaire. Dans les colonnes capillaires, la phase stationnaire est un film fin (de 0,1 à 10 µm), d'un polymère thermiquement stable, qui recouvre la paroi interne de celles-ci tandis que dans les colonnes remplies, la phase stationnaire est un solide poreux inerte enrobé de liquide :

- d'un four qui peut être isotherme ou à température variable
- d'un détecteur.

Parmi les détecteurs, on distingue :

- les détecteurs universels, qui réagissent à tous les composants sauf le gaz porteur. Nous pouvons citer le détecteur à ionisation de flamme (Flame Ionization Detector) ou le détecteur à conductivité thermique (catharomètre). Dans le cas du détecteur à ionisation de flamme, une flamme soumise à une tension positive brûle les effluents en sortie de colonne. Cette combustion produit des ions carbonés de charge positive qui vont être collectés sur une électrode où ils vont créer un courant d'ionisation. Ce courant sera amplifié puis enregistré. Le signal enregistré est proportionnel à la masse du soluté dans le détecteur.  
Le détecteur à conductivité thermique compare le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur mélangé aux molécules de soluté, grâce à deux résistances chauffantes montés en pont de Wheatstone. Le signal enregistré est proportionnel à la concentration du soluté dans le gaz vecteur qui passe dans le détecteur.
- Les détecteurs sélectifs qui sélectionnent les composants chimiques avec des propriétés physiques ou chimiques communes. Nous pouvons citer le détecteur à capture d'électrons.
- Les détecteurs spécifiques qui ne réagissent qu'à un seul composant chimique.

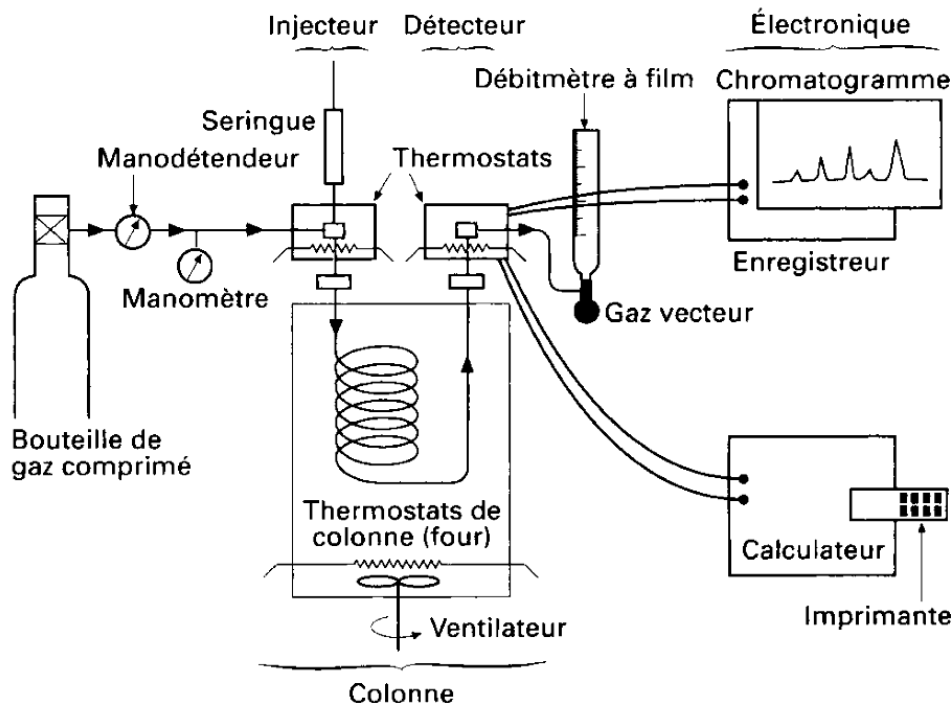


Figure 18 : Principe du chromatographe (figure issue de Tranchant, 1996)

Au cours d'une expérience en chromatographie gaz-liquide, le système est approvisionné en gaz pur, inerte (appelé également le gaz vecteur ou porteur) qui va passer dans l'injecteur et traverser la colonne jusqu'au détecteur. Ce gaz inerte peut être de l'azote, de l'argon, de l'hélium ou de l'hydrogène. Ensuite, l'échantillon (le soluté) est injecté à la tête d'une colonne. Les molécules du soluté vont se mélanger à la phase stationnaire et à la phase mobile. Selon la nature de ces molécules, certaines vont se mélanger plus ou moins rapidement à la phase stationnaire (au substrat) et donc auront une vitesse de migration différente, ce qui permettra de les séparer. Selon le mélange à séparer, le choix de la colonne doit être judicieux. Ce choix repose sur plusieurs paramètres : la phase stationnaire, le diamètre de la colonne, la longueur de la colonne et l'épaisseur de film. Par exemple, la phase stationnaire devrait avoir une polarité proche de celle des composés. De même, les colonnes à film mince réduisent la rétention des composés de poids moléculaire élevé et à point d'ébullition élevée.

Les signaux (les chromatogrammes) sont enregistrés selon l'ordre d'arrivée correspondant au temps de rétention que chaque composante a eu avec le substrat. Une préparation de l'échantillon est nécessaire au préalable. Ainsi, avant de pouvoir analyser des acides gras par chromatographie gazeuse, ils doivent être convertis en acides gras volatiles estérifiés et dans la plupart des cas en méthyles d'acides gras estérifiés. Pour des triglycérides, ce procédé se déroule en deux étapes, l'étape de saponification puis celle de méthylation. Une phase stationnaire apolaire est généralement choisie pour l'étude des acides gras. Nous pouvons citer les phases stationnaires composées soit de phényle (5 %) et de dimethylpolysiloxane (95 %) ou de phényle (5%) et de dimethylarylenesiloxane (95%).

Avant analyse, les acides gras sont convertis en esters méthyliques (Fatty acid methyl esters, FAME) par saponification puis par estérification.

Araujo et al., 2010 a utilisé la chromatographie gazeuse pour déterminer la composition en  $\omega 3$  de certaines huiles telles que l'huile de foie de morue ou de saumon, comparées avec les huiles de phoque et de baleine.

### 3.2.2 Chromatographie gazeuse dans les études de stéatose hépatique non alcoolique

#### (a) Chez l'homme

Pour des études *ex vivo* de l'analyse lipidique hépatique, une portion du foie est prélevée et préparée. Chez le petit animal, ce prélèvement a lieu après l'euthanasie de l'animal. La chromatographie est utilisée pour évaluer les différences entre les différents tissus lipidiques, notamment la graisse sous-cutanée, la graisse viscérale et le foie chez des sujets obèses (Kotronen et al., 2010, Lundbom et al., 2010), chez l'homme.

Les

Chez l'homme, la composition lipidique du foie est donnée en Figure 19.

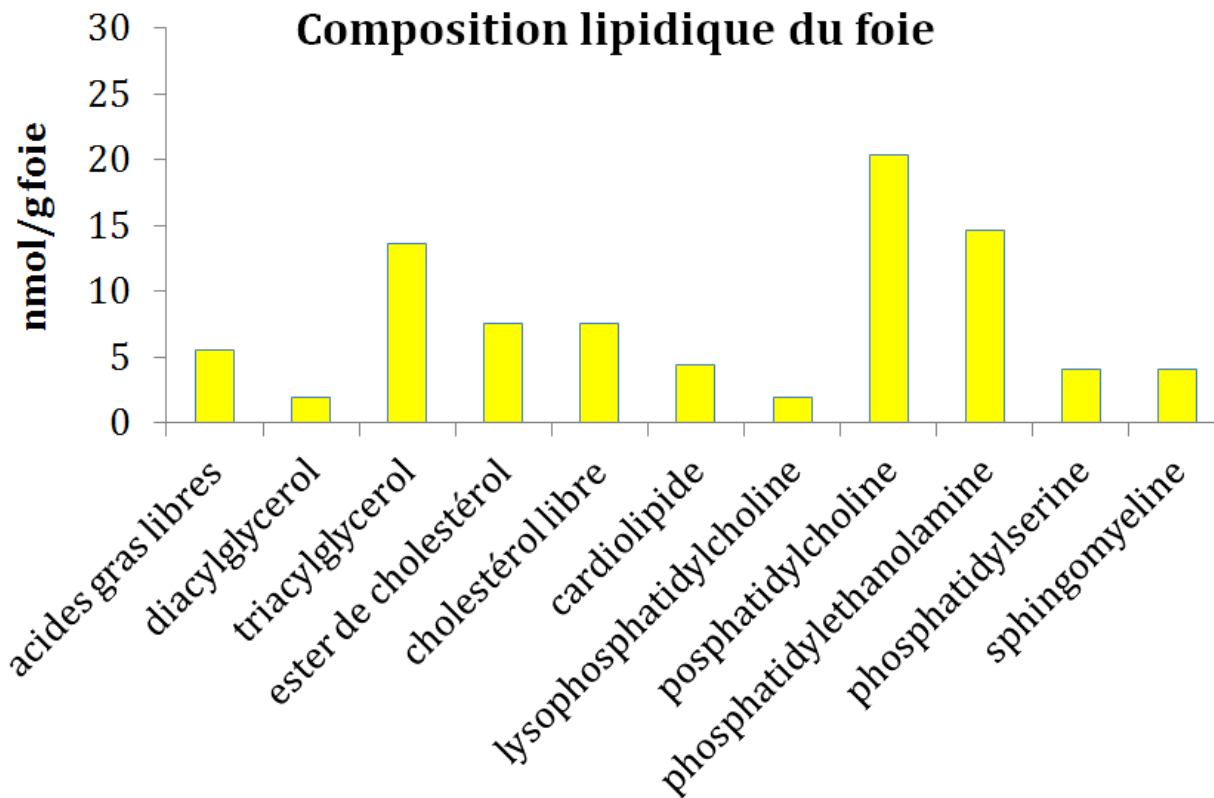


Figure 19 : Composition lipidique moyenne du foie mesurée par chromatographie en phase gazeuse pour une étude menée chez une population de 9 individus sains (2 hommes, 7 femmes)( Puri et al., 2007).

La Figure 19 présente la composition en acides gras, obtenus grâce à la chromatographie gazeuse entre les sujets contrôles, les sujets avec une stéatose et les sujets avec un NASH.

Les patients atteints de stéatose et de NASH présentent un taux significativement plus élevés en acide palmitique (C16 :0) et en acide oléique (C18 :1, n-9).

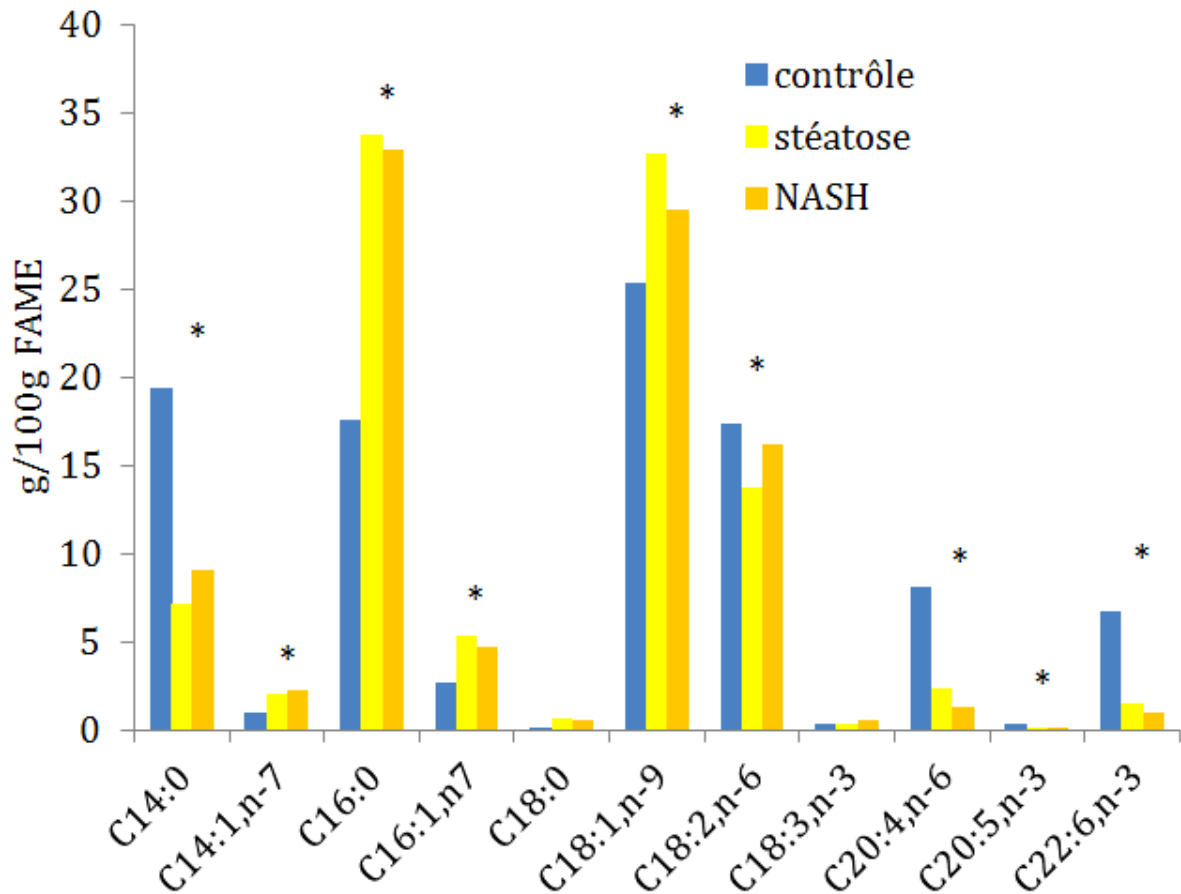


Figure 20 : Composition lipidique moyenne du foie mesurée par chromatographie en phase gazeuse pour une étude menée chez des sujets contrôles (n=11), chez des patients avec une stéatose (n= 10) et chez des patients avec une NASH (n=9). Les différences significatives des patients atteints de stéatose et de NASH comparés aux sujets contrôles sont présentés (\*p<0,01)  
 Figure tirée de Araya et al., 2004 (FAME : esters méthyliques)

(b) Chez le petit animal

Chez le petit animal, la chromatographie gazeuse a surtout servi à déterminer la composition lipidique chez des souris soumis à différents états prandiaux (Deslauriers et al., 1988) ou chez un modèle de rat stéatosique (Marsman et al., 2010). Des mâles Sprague-Dawley ont été nourris en nutrition parentérale totale soit en régime hypocalorique constitué de 5% d'huile de maïs (Corn oil, CO), 79% de sucres, 16% de protéines soit en régime hypercalorique constitué de 70 % d'huile de maïs, 14% de sucres et 16% de protéines. L'huile de maïs contient 55% d'acides gras polyinsaturés (Polyunsaturated fatty acids, PUFA), 30% d'acides gras monoinsaturés (Mono unsaturated fatty acids, MUFA) et 15% d'acides gras saturés (saturated fatty acids, SFA). Parmi les SFA, il y a 80% d'acide palmitique, 14% d'acide stéarique et 3% d'acide arcahémique. 99% des MUFA sont les acides oléiques et 98% des PUFA sont représentés par les acides linoléiques. Une alimentation riche en acides gras insaturés a été démontrée chez le rat qu'elle pouvait produire une NASH. Les deux groupes sont

identifiés comme « 5% CO » et « 70% CO ». Après 21 jours de régime, les rats sont sacrifiés et leurs foies sont prélevés. En combinaison avec la spectrométrie de masse (3.3.1), la chromatographie gazeuse a pu mettre en évidence la composition en acides gras des trois classes de lipides hépatiques : les triglycérides, les phospholipides et les acides gras libres (Wu et al., 2011). Les triglycérides représentent la classe de lipides la plus importante (Figure 21). Ainsi, avec un régime à «70% CO », majoritairement riches en PUFA, semble se répercuter sur la composition en PUFA (C18 :2) des triglycérides hépatiques.

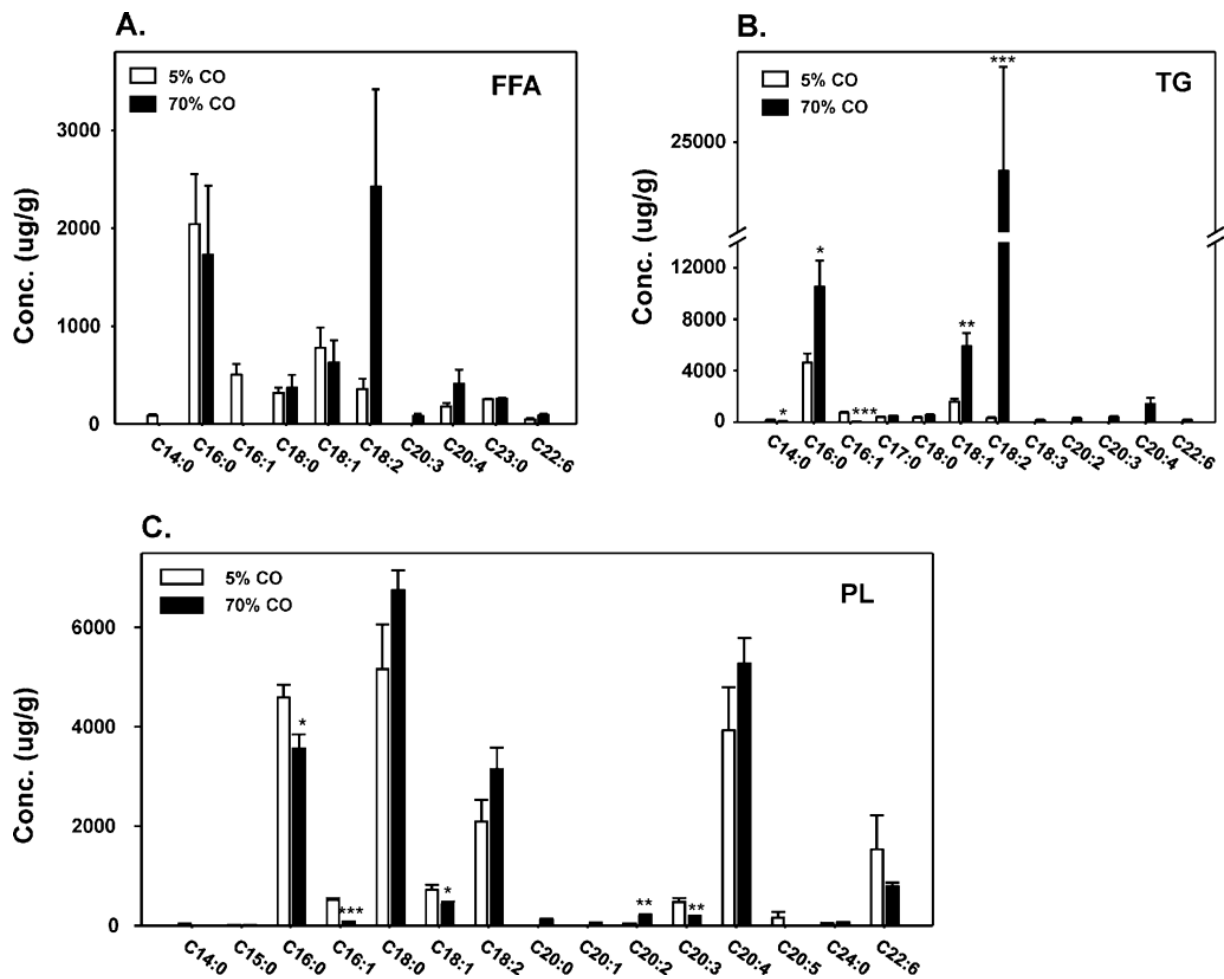


Figure 21 : Profils en acides gras identifiés par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse en acides gras libres (A), en triglycérides (B), et en phospholipides (C) des foies de rat nourris à « 5% CO » et à « 70% CO ». Graphes issus de Wu et al., 2011

### 3.2.3 Chromatographie gazeuse dans les études de cancer hépatique

Afin de caractériser les HCC, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (3.3.1) est utilisée afin d'analyser les lipides issus du plasma chez les patients atteints de HCC (Patterson et al., 2011). Ainsi, une très faible quantité voire minimale d'acide tétracosanoïque (acide lignocérique, C24:0) et d'acide tétracosénoïque (acide nervonique, C24:1) a été relevée chez le plasma des patients atteints de HCC.

Chez un modèle de souris où le gène *fat-1* a été incorporé, généré par l'équipe de Kang et al., 2004, la souris mutée est capable d'ajouter une double liaison sur une chaîne insaturée d'acides gras et convertir des chaînes *n-6* en *n-3* (les mammifères ne peuvent synthétiser naturellement les acides gras oméga-3 (*n-3*) à partir des acides gras oméga-6 (*n-6*) qui sont présents en plus grand nombre et doivent faire appel au régime alimentaire). Les tissus de ces souris présentent une abondance de chaînes d'acides gras *n-3* et une réduction en chaînes d'acides gras insaturés *n-6*, en l'absence de d'acides gras *n-3* dans le régime alimentaire. Soumis à un traitement en diethylnitrosamine (DEN), une baisse de la formation des tumeurs est constatée chez ce modèle de souris qui s'accompagne d'une élévation endogène d'acides gras polyinsaturés *n-3*. Les foies de ces souris ont été comparés à celles des souris contrôles traités au DEN grâce à la chromatographie gazeuse, sur la proportion des acides gras insaturés (Weylandt et al., 2011).

### 3.3 Autres techniques d'analyse des lipides

En plus de la chromatographie gazeuse, une large gamme de techniques d'analyses pour la caractérisation des acides gras existe. Nous pouvons citer :

- la chromatographie sur couches minces (ou Thin Layer Chromatography-TLC) ;
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid chromatography, HPLC) ;
- la spectrométrie de masse (mass spectrometry, MS) ;
- la chromatographie en phase supercritique (ou Supercritical Fluid Chromatography, SFC).

L'analyse par couplage de ces différents techniques peut également être réalisé tel que GC/MS, SFC/MS et HPLC/MS.

#### 3.3.1 La spectroscopie de masse (Mass Spectrometry, MS)

La spectroscopie de masse est une technique d'analyse dont le principe repose sur le bombardement des molécules organiques par des électrons ou des espèces ioniques afin d'ioniser ces molécules et les fragmenter. Les espèces ioniques produites sont ensuite séparées selon le rapport *masse-charge*  $m/z$  et sont détectées selon leur

proportion dans la molécule. Un spectrogramme représentant la masse des ions et leur abondance, (parfois relative par rapport à une référence) peut être tracé.

L'ionisation de la molécule  $M$ , sous le bombardement des électrons, est réalisée selon l'équation suivante :  $M + e^- \rightarrow M_+^{\bullet} + 2e^-$

Avec  $M_+^{\bullet}$  est l'ion moléculaire et correspond à la masse molaire de la molécule.

Cet ion moléculaire va ensuite se fragmenter et donner des cations de masse moins élevées, qui vont être analysés et détectés.

Le système comporte :

- une source afin d'obtenir des ions en phase gazeuse ;
- une interface qui focalise et transmet les ions ;
- un analyseur qui sépare les ions en fonction de  $m/z$  ;
- un détecteur pour recueillir les ions.

Parmi les sources d'ions, on peut citer :

- la source à impact électronique (electronical impact EI) ;
- la source à ionisation chimique (chemical ionisation CI) ;
- la source à électronebulisation (electrospray ES) ;
- l'ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (liquid secondary ionisation mass spectrometry LSIMS - fast atom bombardement FAB).

Les analyseurs ou les séparateurs d'ions reposent sur plusieurs modes entre autres par déflexion par un champ magnétique, par champ électrique ou par la mesure d'un temps de vol (Time of Flight TOF).

Sur un spectre de masse, on distingue :

- le pic de base qui est le pic qui présente l'intensité la plus importante. Il correspond à l'ion le plus important ;
- le pic de l'ion moléculaire ou le pic parent, correspond à la masse de la molécule neutre avec un électron en moins ;
- les pics des fragments.

Sur l'exemple de spectre du palmitate de méthyle (ou l'acide palmitique) :

- le pic moléculaire  $M^+$  est à  $m/z = 270$  ;
- le pic de l'ion à  $m/z = 239 [M - 31]^+$  correspond à la perte d'un groupement méthoxyle ;



- le pic de l'ion à  $m/z = 227 [M - 43]^+$  correspond à la perte d'une unité  $C_3$  (les carbones 2 à 4).

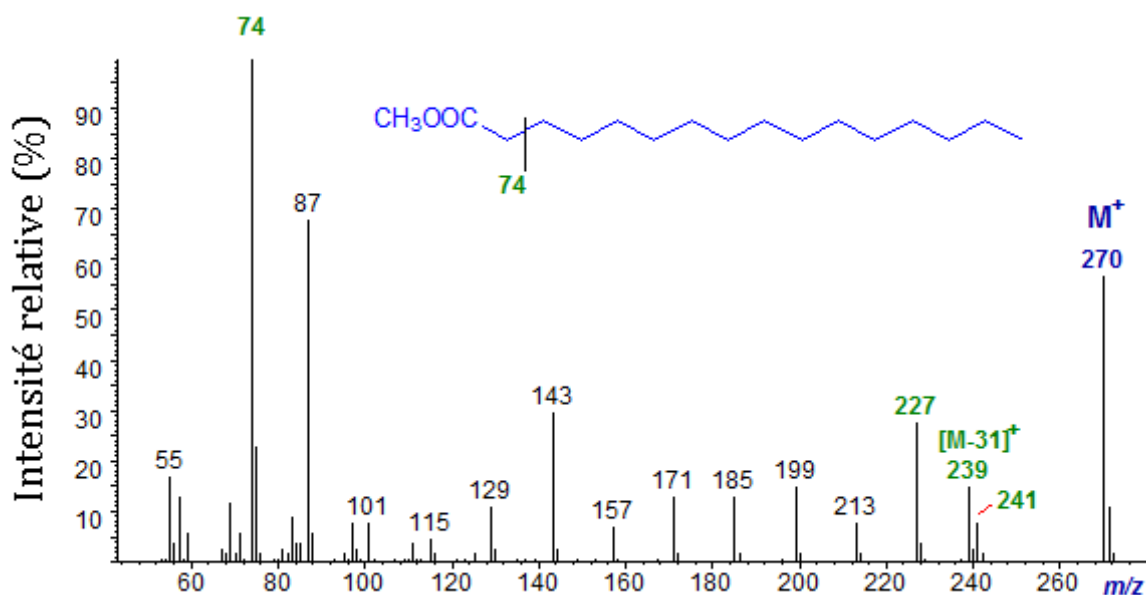


Figure 22- Spectre de masse du methyl palmitate (figure tirée de <http://lipidlibrary.aocs.org/>)

La spectroscopie de masse couplée à la chromatographie gazeuse est très utilisée dans l'étude des acides gras. (Nunome et al., 2010)

#### 4. Etudes par SRM de la stéatose et cancer hépatique

##### 4.1 Par spectroscopie haute résolution à l'angle magique

En spectroscopie haute résolution à l'angle magique (HRMAS) le tube est tourné et est orienté d'un angle de  $54,7^\circ$  dit « magique » par rapport au champ  $B_0$  afin de réduire les inhomogénéités et les susceptibilités magnétiques présentes ainsi que les couplages dipolaires. La rotation à l'angle magique diminue de 30 % la largeur à mi-hauteur de signaux par rapport à la spectroscopie haute résolution conventionnelle (Desmoulin et al., 2008). La technique HRMAS permet de détecter à la fois les lipides à mouvements anisotropes (les lipides membranaires) ainsi que ceux à mouvements isotropes rapides comme les triglycérides.

*Ex vivo*, la technique de HRMAS est appliquée aussi bien pour des prélèvements de tissus hépatiques humains et animaux. Des études qualitatives réalisées sur des prélèvements de foie ont permis de déterminer les constituants d'un foie sain chez le rat (Bollard et al., 2000) et de foies humains pour des sujets sains et cirrhotiques (Martinez-Granados et al., 2006).

Xu et al., 2009 exploite la technique HRMAS pour l'analyse de tissus intacts (qui ne nécessitent pas d'extraction des composés physico-chimiques en présence) de foie chez un modèle de souris diabétiques (Figure 23) . Nous pouvons remarquer que la stéatose chez la souris diabétique se traduit par des intensités des résonances des triglycérides plus élevées chez celle-ci que chez la souris contrôle.

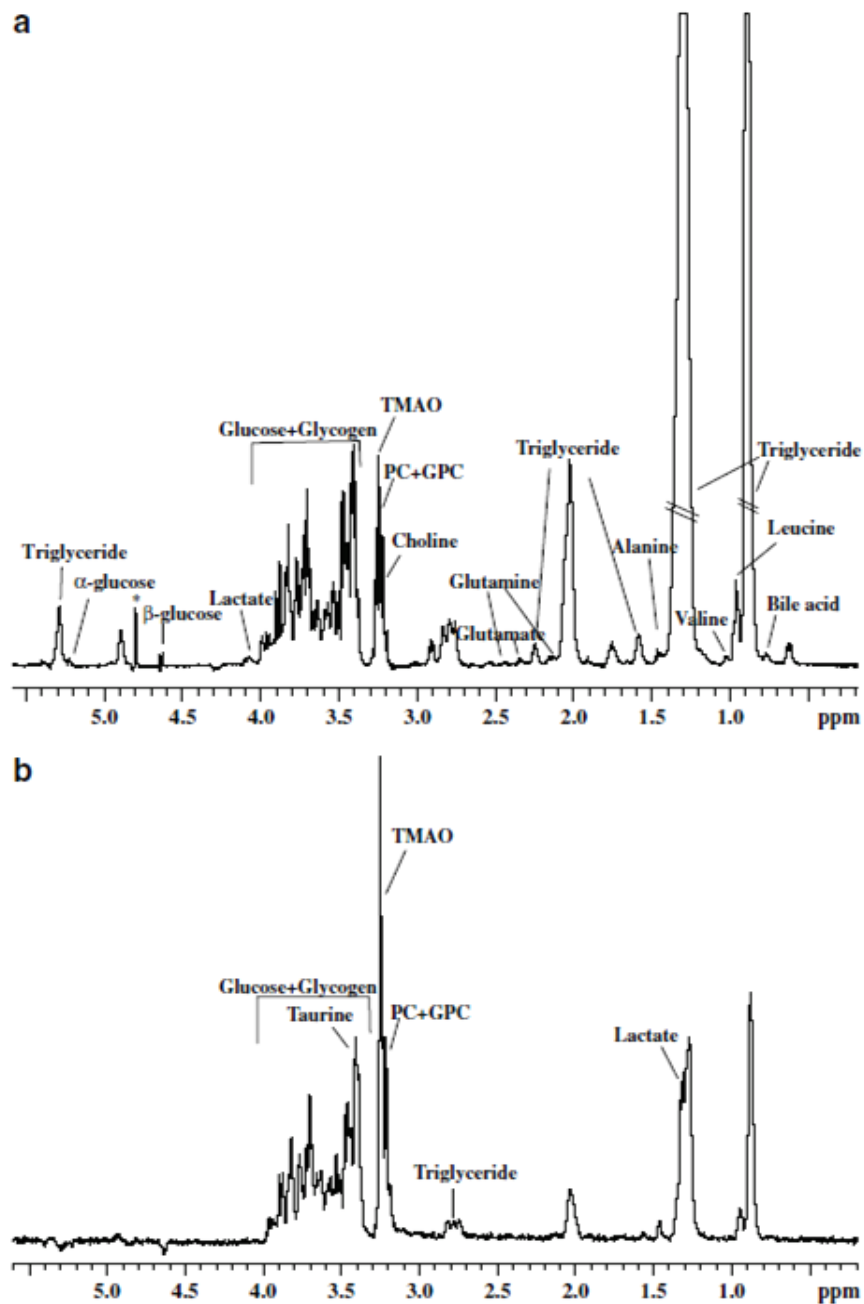


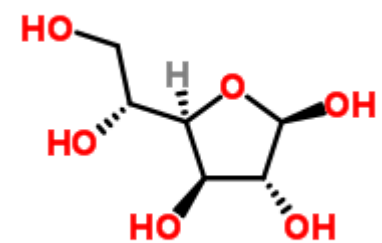
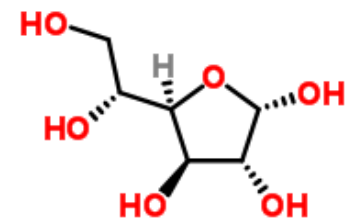
Figure 23 : Spectres WET CPMG (Water suppression enhanced through T1 effect Carr-Purcell-Meiboom-Gill) HRMAS d'un prélèvement de foie d'une souris diabétique (a) et de son contrôle (b) (figures reproduites de Xu et al., 2009).

L'analyse HRMAS ex-vivo des prélèvements de foie chez le rat et chez l'homme ont permis d'établir la liste des métabolites détectés (Table 10).

Métabolite	Groupement chimique	Multiplicité de la résonance	Déplacement chimique	Formule chimique
Acétate	CH <sub>3</sub>		1,93	
Alanine	αCH	q	3,79	
	βCH <sub>3</sub>	q	1,47	
Choline	N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	s	3,2	
	CH <sub>2</sub> (NH)	m	3,51	
	CH <sub>2</sub> (OH)	m	4,07	
Créatine	N(CH <sub>3</sub> )	s	3,03	
	CH <sub>2</sub>	s	1,93	
Dimethylglycine	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	s	2,93	
	CH <sub>2</sub>	s	3,57	

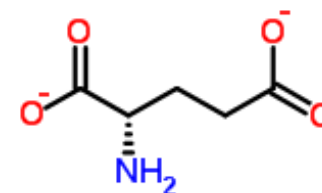
---

α-Glucose	C1H	d	5,24
	C2H	dd	3,56
	C3H	dd	3,70
	C4H	dd	3,40
	C5H	ddd	3,83
	moitié CH <sub>2</sub> C6H	dd	3,72
β-Glucose	moitié CH <sub>2</sub> C6H	dd	3,85
	C1H	d	4,65
	C2H	t	3,25
	C3H	t	3,47
	C4H	dd	3,40
	C5H	dd	3,47
	moitié CH <sub>2</sub> C6H	dd	3,78
moitié CH <sub>2</sub> C6H	dd	3,90	

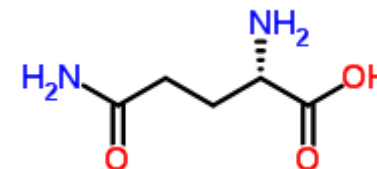


---

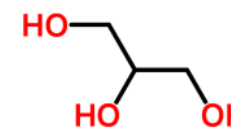
Glutamate	$\alpha$ CH	t	3,76
	$\beta$ CH	dt	2,06
	$\beta'$ CH	dt	2,06
	$\gamma$ CH <sub>2</sub>	t	2,36



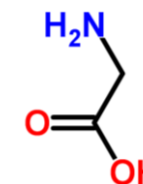
Glutamine	$\alpha$ CH		3,77
	$\gamma$ CH <sub>2</sub>		2,44
	$\beta$ CH <sub>2</sub>		2,12

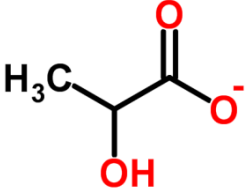
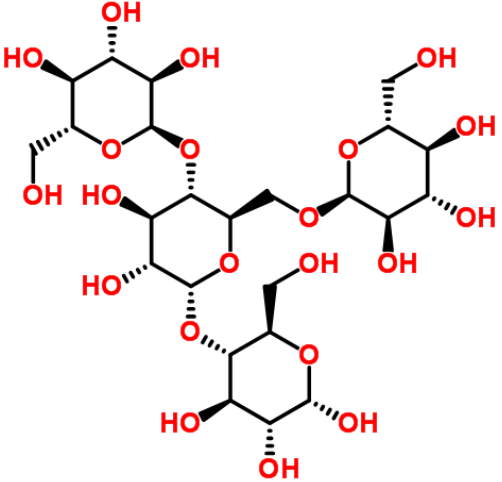
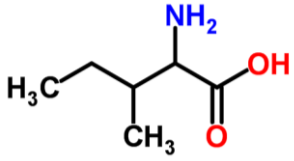


Glycérol	moitié CH <sub>2</sub>	dd	3,56
	moitié CH <sub>2</sub>	dd	3,63
	C2H	m	3,87



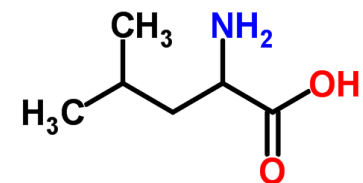
Glycine	CH <sub>2</sub>	s	3,57
---------	-----------------	---	------



<i>lactate</i>	$CH_3$			1,33	
	$CH$			4,12	
<i>glycogène</i>	$C1H(\alpha 1 \rightarrow 4)$	d		5,41	
	$C1H(\alpha 1 \rightarrow 4)'$	d		5,40	
	$C2H$	dd		3,63	
	$C3H$	dd		3,98	
	$C4H$	q		3,66	
	$C5H$	q		3,66	
	$C6H$	d		3,87	
		$\alpha CH$			
<i>Isoleucine</i>	$\beta CH$			1,99	
	$\gamma CH_2$			1,26	
	$\delta CH_3$			1,00	

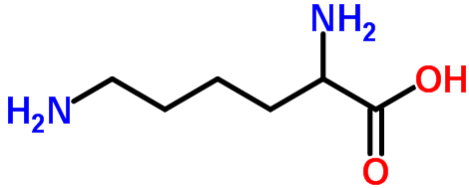
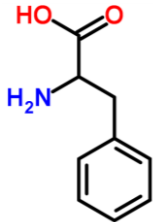
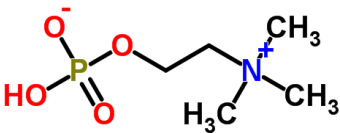
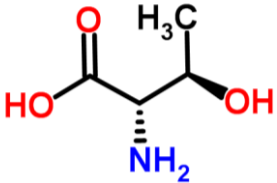
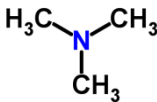
---

leucine	$\delta CH_3$		0,95
	$\gamma CH$		1,71
	$\beta CH_2$		1,70
	$\alpha CH$		3,74



lipides	$CH_3-(CH_2)_n$	t	0,87
	$-(CH_2)_n$	m	1,29
	$CH_3-CH_2-CH_2$	m	1,3
	$CH_2-CH_2-CO$	m	1,59
	$CH=CH-CH_2-CH_2$	m	2
	$CH_2-CH_2-CO$	m	2,25
	$CH=CH-CH_2$	m	2,80
	$CH=CH$	m	5,3
	$CH=CH-CH_2-$		



Lysine	$\alpha\text{CH}$	t	3,77	
	$\beta\text{CH}_2$	m	1,91	
	$\gamma\text{CH}_2$	m	1,45	
	$\delta\text{CH}_2$	q	1,71	
	eCH <sub>2</sub>	t	3,03	
phenylalanine	$\text{CH}_{2,6}$		7,31	
	$\text{CH}_4$		7,38	
Phosphocholine	$\text{N}+(\text{CH}_3)_3$	s	3,22	
	$\text{NCH}_2$	m	3,60	
	$-\text{PO}_3\text{CH}_2$	m	4,18	
Threonine	$\alpha\text{CH}$	d	3,60	
	$\beta\text{CH}$	m	4,28	
	$\gamma\text{CH}$	d	1,32	
Trimethylamine-N-oxide	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	s	3,27	

---

Tyrosine

*C<sub>3</sub>H*

6,88

*C<sub>5</sub>H*

7,18

Valine

*γCH<sub>3</sub>*

0,98

*γCH<sub>3</sub>*

1,04

*βCH*

2,28

---

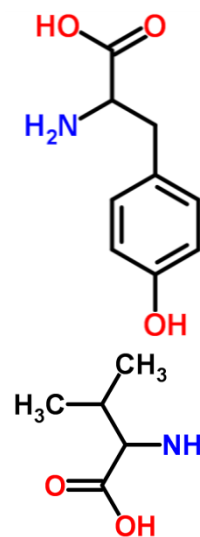


Table 10 : Liste des différents métabolites déterminée par HRMAS du foie chez le rat (Bollard et al., 2000) et chez l'homme (Martinez-Granados et al., 2006). Les métabolites présents uniquement chez l'homme sont en italique et ceux uniquement chez le rat sont en gras, les autres métabolites sont communs aux deux populations (d : doublet, dd : doublet de doublet, ddd : doublet de doublet de doublet, dt : doublet de triplet, s : singulet, m : multiplet, q : quintuplet).

## 4.2 SRM *in vivo* dans les études de stéatose hépatique non alcoolique

### 4.2.1 Chez l'homme

La plupart des études chez l'homme se focalise sur le calcul de la quantité lipidique (QL) ou de la fraction lipidique, et calculé tel que  $QL = \frac{\text{lipides}}{\text{lipides} + \text{eau}}$ , les résonances entrant dans le calcul de cet indice varie selon les expérimentateurs (Table 8). En plus des résonances lipidiques, d'autres métabolites ont pu être quantifié grâce à l'introduction de la suppression d'eau afin de mieux détecter ceux-ci. Ainsi, la choline et ses dérivés (Choline Complex Compounds, CCC) qui résonne dans la région de [3,2-4] ppm, le complexe glutamine-glutamate ont pu être évalué dans le cas d'hépatites chroniques (Cobbold et al., 2009, Cho et al., 2001) ou d'hépatocarcinomes (Kuo et al., 2004). Dans le cadre de la quantification de la graisse, la spectroscopie est reconnue comme la méthode de référence non-invasive. A ce titre, elle sert de référence quand il s'agit de valider une séquence d'imagerie de quantification de la graisse (Guiu et al., 2009, Ishizaka et al., 2011).

La Table 11 présente les paramètres de traitement des données et observation dans les études de spectroscopie *in vivo* du foie répertoriées chez l'homme.

Auteur	Sujets	Méthode de Quantification	Observations/Conclusion
Szczepaniak et al., 2005	Echantillon représentant la population générale américaine	NUTS	Une quantité lipidique >5% définit une stéatose, ce qui donne une prévalence de la stéatose de 30% chez la population générale
Ishii et al., 2005	Sujets de poids normaux à obèses moyens et atteints de diabète de type 2	GRAM	Corrélation significative (r=0,46) entre la quantité lipidique et le dosage plasmatique des triglycérides
Johnson et al., 2008	Contrôle, obèse sans stéatose, obèse avec stéatose	QUEST	Les patients obèses avec et sans stéatose présentent une élévation dans les composantes saturées et une baisse dans les composantes polyinsaturées comparés aux sujets contrôles.
Orlacchio et al., 2008	Patients atteints d'hépatite C	Intégration	Une corrélation significative directe entre le rapport $\frac{1,3+0,9}{4,7}$ et la sévérité de la fibrose est établie: plus la fibrose est avancée, plus le rapport est élevé
d'Assignies et al., 2009	Patients atteints de stéatose	LCMODEL	La fraction lipidique $(\frac{2'+1,3'+0,9'}{2'+1,3'+0,9'+4,7'})$ calculée par SRM est bien corrélée avec celle calculée en histologie (r=0,773, p<0,001)

Table 11 : Paramètres de traitement des données et observation dans les études de spectroscopie *in vivo* du foie répertoriées chez l'homme.

Auteur	Sujets	Méthode de Quantification	Observations/Conclusion
Hamilton et al., 2010	NAFLD confirmé ou suspecté	AMARES	Sur le spectre du foie, les intensités du pic à 2,1 ppm sont corrélées avec celles du 1,3ppm (r=0,991) ainsi que celles du 1,3 ppm avec celles du 0,9 ppm (r=0,989). Chez les sujets avec un fort taux d'acides gras, l'intensité de la résonance à 2,8 ppm ne participe qu'à 0,6%
Larson-Meyer et al., 2010	Enfants pré pubères de poids normaux et en surpoids	AMARES	La quantité lipidique est significativement corrélée aux marqueurs de l'insulino-résistance
van Werven et al., 2010	Patients suspectés d'avoir une stéatose, séparés en deux groupes selon la présence de diabète de type 2	AMARES	La fraction des acides gras insaturés ( $\frac{5,3}{5,3+4,7}$ ) est significativement plus élevée chez les patients atteints de diabète de type 2 alors qu'il n'y a aucune différence au niveau du rapport $\frac{1,3}{1,3+4,7}$
Georgoff et al., 2012	candidats à une biopsie du foie	Intégration	La corrélation de la quantité lipidique (QL) avec l'histologie a permis de définir de nouveaux seuils pour la gradation de la stéatose : QL<17 % : grade 0, QL<38% : grade 1, QL > 38% : grade 2

Table 11 : Paramètres de traitement des données et observation dans les études de spectroscopie *in vivo* du foie répertoriées chez l'homme.

## 4.2.2 Chez le petit animal

Les études chez le petit animal sont répertoriées à la Table 12.

Auteur	Méthode de Quantification	Observations
Garbow et al. 2004	Modèle bayésien	Bonne corrélation de la quantité lipidique avec les valeurs de dosage des triglycérides
Calderan et al. 2006	Intégration des pics	Baisse du contenu de l'eau chez les souris obèses par rapport à leur contrôle
Delgado et al. 2009	Intégration des pics	Quantité lipidique plus élevée chez les rats nourris au régime hyperlipidique comparée au régime standard
Lim, Son et al. 2009	Intégration des pics	Quantité lipidique plus élevée chez les rats nourris au régime hyperlipidique comparée au régime standard
Corbin, Furth et al. 2009	Modèle lorentzien/gaussien	Elévation de l'insaturation lipidique chez les animaux stéatosiques et atteints de NASH
Marsman et al. 2010	Intégration des pics	Baisse du contenu de l'eau chez les souris stéatosiques par rapport à leur contrôle
van Werven et al. 2011	Modèle lorentzien (jMRUI)	Elévation de l'insaturation chez les rats stéatosiques
Cheung, Fan et al. 2011	Intégration des pics	Elévation de la quantité totale des lipides à cause de l'élévation des composantes saturées
Ciapaite et al. 2011	Modèle lorentzien/gaussien (AMARES)	Quantité lipidique plus élevée chez les rats nourris au régime hyperlipidique comparée au régime standard
Peng, Ju et al. 2011	Intégration des pics	Excellente corrélation de la quantité lipidique avec le dosage hépatique
Ye, Fuchs et al. 2011	LC Model	Elévation de l'intensité de la résonance 1,3 ppm chez les souris obèses
Ramamonjisoa et al. 2012	MSV	Quantité lipidique plus élevée chez les souris nourries au régime hyperlipidique comparée au régime standard chez les souris contrôles et aucune différence entre les deux régimes au sein des souris modèles

Table 12 : Paramètres de traitement des données et observations dans les études de spectroscopie *in vivo* du foie répertoriées chez le petit animal

### 4.3 SRM dans les études de cancer hépatique

Chez l'homme, une étude *ex-vivo* d'échantillons de foie normaux, cirrhotiques ou de HCC, Soper et al., 2002 ont montré une élévation de la choline (dont le singulet résonne à 3,2 ppm) ainsi qu'une diminution des lipides (représenté par le groupe méthylène qui résonne à 1,3 ppm) chez échantillons de HCC comparés aux foies cirrhotiques et normaux. *In vivo*, l'équipe de Kuo et al., 2004 a réussi à différencier un foie normal d'une tumeur bénigne ou maligne. Chez un HCC, le rapport  $\frac{3,2}{1,3}$  est plus élevé par rapport à un foie normal et à une tumeur bénigne où cette différence est significative. De plus, la choline est connue comme un marqueur de cancer et sa concentration est élevée dans les tumeurs par rapport au tissu sain (Kim et al., 2003).

Chez le petit animal, Foley et al., 2001 ont étudié un modèle chimique d'HCC. Des rats Wistar sont traités au DEN, qui leur est injecté une seule fois. Six semaines après le traitement, des nodules se développent. Cette phase s'accompagne d'une élévation significative des intensités des groupements méthyle (0,9 ppm) et méthylène (1,3 ppm), ce qui est corrélé avec la présence de vacuoles lipidiques vues en histologie. Pendant les semaines 12, 18 et 24, ces deux intensités baissent. Cette période s'accompagne de la présence d'HCC mais également de l'élévation des intensités des résonances des groupements allylique (2 ppm) et oléfinique (5,3 ppm). Dans le cadre d'une tumorigenèse, il semblerait que les intensités de résonances saturées s'élèvent au cours de la différenciation et qu'elles baissent une fois celle-ci terminée. L'élévation de résonances insaturées serait, entre autres, attribuée, à la nécrose cellulaire, confirmée par l'histologie. Par contre, Towner et al., 2002 ont constaté une diminution de l'intensité de la résonance 1,3ppm ainsi que celle de la résonance 2 ppm chez des rats traités au nodularin (LD50).

La technique de SRM sert aussi de support aux études métabolomiques. Ainsi, Griffin and Shockcor, 2004 ont présenté dans un article de revue les principaux métabolites identifiées dans les extraits de tissue ou *in vivo* par spectroscopie de résonance magnétique.

## C. Conclusion

La stéatose est définie comme une accumulation de triglycérides. Elle peut se développer génétiquement, comme chez le cas de la GSD 1a ou via un régime induisant une obésité, à la suite d'un régime alimentaire riche en graisses et/ou en sucres.

Nous nous sommes intéressés au cours de cette revue de littérature à présenter les mécanismes biologiques à l'origine de la stéatose du foie mais également des HCC, comme elles se présentent chez les patients atteints de GSD 1a. Les lipides sont les molécules mis en jeu lors du développement de la stéatose. Le comportement de ces lipides ont été présenté dans le cadre de la stéatose mais aussi dans celui les HCC. Ainsi, l'état du foie, qu'il y ait présence de fibrose ou pas, présence de nécrose ou pas, intervient sur le comportement de ces lipides. Nous nous sommes attardés ensuite sur les techniques permettant une analyse fine des triglycérides hépatiques, notamment la SRM et la CG. Ces deux techniques serviront à réaliser les études abordées au cours de cette thèse. Les moyens mis en œuvre sont détaillés dans le chapitre II et les applications dans le chapitre III.



## Chapitre II. Méthodologies

L'objectif de ce travail était de mettre en place une méthodologie d'acquisition et de traitement pour l'étude *in vivo* des lipides hépatiques chez un modèle murin de glycogénose. Cette méthodologie inclut une validation *in vitro* sur des échantillons lipidiques. Ce chapitre présente les échantillons analysés, le modèle de souris de glycogénose développé et étudié par l'équipe de biologistes avec laquelle l'étude *in vivo* a été réalisée (F. Rajas, Unité Inserm 855 "nutrition et cerveau"), ainsi que le choix des paramètres pour chacune des études. L'étude *in vivo* est complétée par une analyse des lipides hépatiques par la chromatographie gazeuse, qui sera également présentée.

### A. Matériel

#### 1. Echantillons

##### 1.1 Acides gras simples

Les acides gras simples choisis pour l'étude *in vitro* présentée au chapitre III sont les acides gras insaturés : l'acide oléique (C 18 :1) et l'acide linoléique (C18 :3). Ces acides gras ont l'intérêt de présenter à la fois les résonances saturées et insaturées. Les caractéristiques de ces acides gras sont présentées en Table 13.

Acides gras	Masse molaire (g/mol)	Température de fusion (°C)	Forme	Densité (g/cm <sup>3</sup> ) à 25°C
Acide oléique (C18 :0)	282,46	13-14°C	Liquide	0,895
Acide linoléique (C18:3)	278,43	-11°C	Liquide	0,914

Table 13 : Caractéristiques des acides gras simples (acide oléique, acide linoléique)

Pour la préparation des échantillons, les acides gras ont été dissous dans du chloroforme deutéré avec le tétraméthylsilane, dans une proportion de 50 mg/ml selon les

recommandations de Sigma Aldrich pour une concentration respectivement de 42 mmol/L et 35 mmol/L pour l'acide oléique et l'acide linoléique.

## 1.2 Le trioléate et l'huile de tournesol

Le trioléate (ou le 1,2,3 propanetriyl trioleate ou le glyceryl trioleate) est un triglycéride constitué par trois acides oléiques. Il a été dissous dans du chloroforme deutéré avec le tétraméthylsilane dans une proportion de 100 mg/ml pour le trioléate, pour une concentration de 11 mmol/L. Les caractéristiques du trioléate sont présentées en Table 14.

Echantillon	Masse molaire (g/mol)	Température de fusion (°C)	Forme	Densité (g/cm <sup>3</sup> ) à 25°C
Glyceryl Trioleate	885,43	-5	liquide	0,91

Table 14 : Caractéristiques du trioléate.

L'huile de tournesol est une huile complexe, choisie à cause de son fort taux d'acides gras polyinsaturés, et achetée dans le commerce. Les huiles de tournesol disponibles dans le commerce ne sont pas pures à 100%. De la vitamine E est ajoutée afin d'éviter l'oxydation de celle-ci. De plus, certaines huiles de tournesol peuvent être enrichies en acide oléique. Nous avons choisi une huile de tournesol standard et considéré que sa composition était similaire à une huile de tournesol pure, telle que présentée à la Table 15, puisque la vitamine E n'intervient pas dans le signal de l'huile de tournesol.

Acide gras	Formule	Proportion (%)
Acide palmitique	C16 : 0	6
Acide stéarique	C18 : 0	3
Acide oléique	C18 : 1	35
Acide linoléique	C18 : 2	50
Acide linoléique	C18 : 3	3
Acide arachidique	C20 : 0	3

Table 15 : Composition de l'huile de tournesol.

Les préparations d'acides gras simples et de trioléate ont été réparties dans des flacons hermétiques de 5 ml pour former des aliquotes. Ils ont été conservés au congélateur à -18°C à l'abri de la lumière, emballés dans du papier aluminium. L'échantillon d'huile de tournesol a été conservé dans un endroit sec, à l'abri de la chaleur. Les spectres sont acquis à la température ambiante. Les protons intervenant dans chaque résonance pour l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate sont donnés en Table 16.

Echantillon /Résonance	Acide oléique	Acide linoléique	Trioléate
5,3	2	6	6
5,2	RI	RI	1
4,29	RI	RI	1
4	RI	RI	1
2,8	2	4	6
2,25*	2	2	6
2	4	4	12
1,6	2	2	6
1,3	20	8	60
0,9	3	3	9

Table 16 : Nombre de protons théoriques pour l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate, \* résonance à 2,32 ppm pour le trioléate, RI : résonance inexistante.

Pour l'huile de tournesol, le nombre de protons total pour chaque résonance est le résultat du nombre de protons qui constitue cette résonance multiplié par la contribution relative pour chaque acide gras et sommé pour tous les acides gras qui présentent cette résonance.

## 2. Modèle animal

Le gène *G6pc* a été invalidé spécifiquement dans le foie (*L-G6pc*<sup>-/-</sup>) chez des souris mâles par une stratégie de stratégie CRE-LOX (cf Annexe) inducible par le tamoxifène. Une étude préalable a permis de caractériser ce modèle (Mutel et al., 2011). Ce modèle présente l'intérêt d'être viable contrairement au modèle de souris invalidées totalement pour le gène de la glucose-6-phosphatase. Il présente les mêmes symptômes hépatiques (stéatose, hépatomégalie) que les patients atteints de GSD1. Ainsi, ce modèle présente une stéatose macrovacuolaire périportale (Figure 24), une hépatomégalie (Figure 25), un taux plus élevé de triglycérides hépatiques et de glycogène par rapport aux souris contrôles (Figure 26).

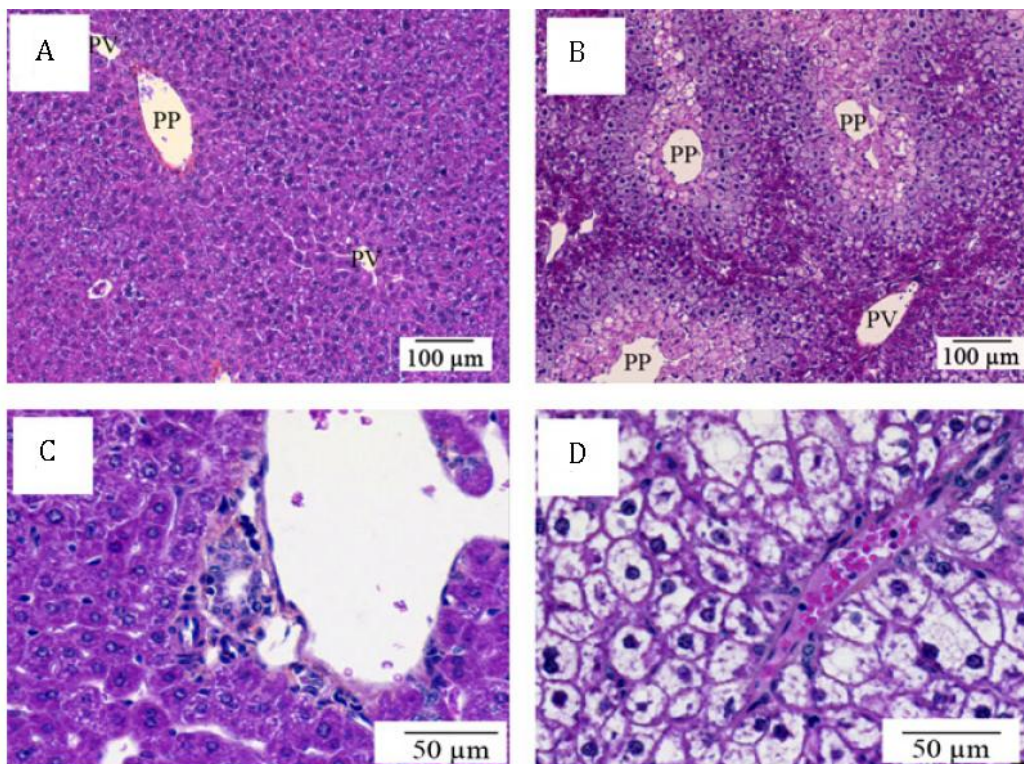


Figure 24 : Lames histologiques colorées avec l'hématoxyline et l'éosine ; foie contrôle (A, C), foie *L-G6pc*<sup>-/-</sup> (B, D) : la présence de vacuoles lipidiques en périportale PP, PV : portal vein)

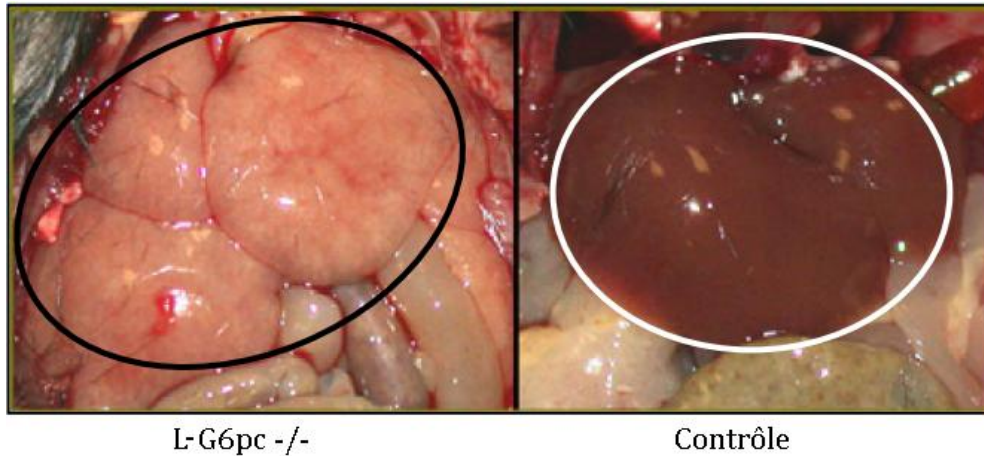


Figure 25 : Aspects des foies chez une souris *L-G6pc -/-* et une souris contrôle.

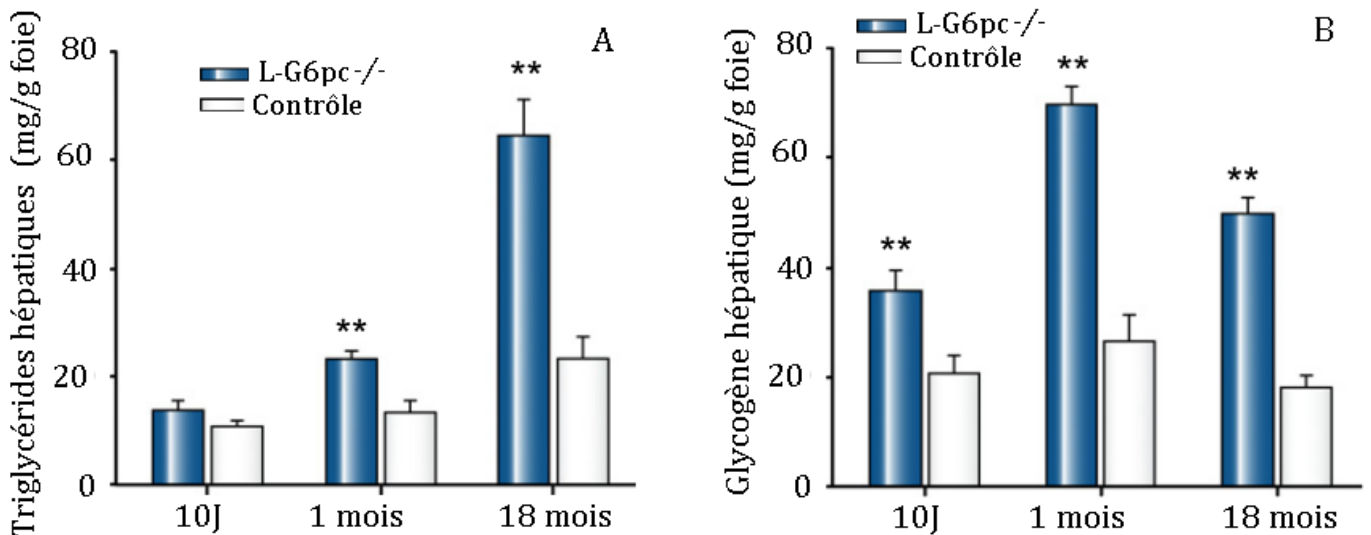


Figure 26 : Triglycérides hépatiques (A) et glycogène hépatique (moyenne±SEM) chez les souris *L-G6pc -/-* (barre bleue) et les souris contrôle (barre blanche). Les données ont été recueillies à 10 jours, 1 mois et à 18 mois après les injections de tamoxifène, chez des souris à jeun pendant 6h (n = 6 souris par groupe). Les valeurs significativement différentes des contrôles sont indiquées (\* p<0,01, \*\* p<0,05).

Ce modèle développe de multiples nodules adénomiques caractérisés par IRM (Mutel et al., 2011) et les nodules commencent à apparaître à partir de 9 mois d'inactivation du gène. Le foie présente un aspect plus granuleux (B et C) comparé à un foie contrôle (A) (

Figure 27).

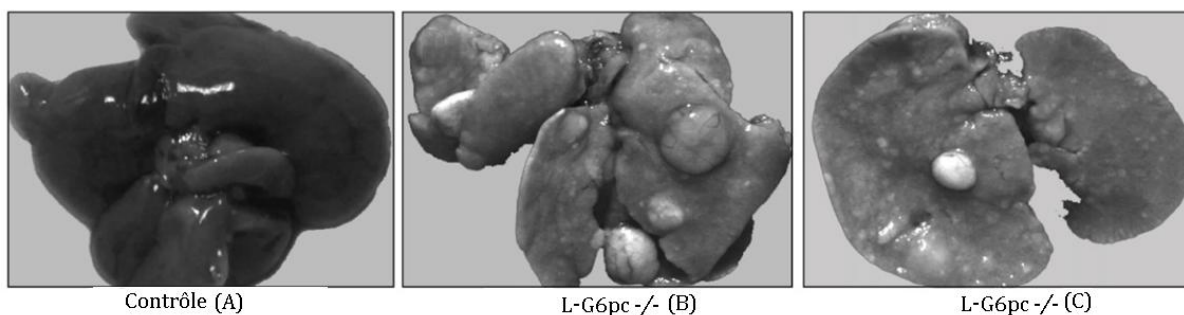


Figure 27 : Foies prélevées après 18 mois chez une souris contrôle (A), ou chez des souris L-G6pc -/- avec de multiples nodules tumoraux (B et C).

Chez l'homme, pour limiter le développement de la stéatose, les patients sont soumis à un régime alimentaire strict. Ce modèle de souris permettra donc l'étude de l'influence d'un régime alimentaire riche en graisses et en sucres sur une stéatose déjà installée. Pour cette raison, les modèles animaux sont soumis pendant 9 mois, soit à un régime alimentaire standard (noté STD) soit à un régime alimentaire riche en graisses et en sucres (ou High fat High Sucrose en anglais, noté HFHS).

Des souris témoins C57Bl6/J (Charles River, L'Arbresle) ont été soumises aux mêmes régimes.

## 2.1 Les régimes alimentaires

Le régime alimentaire STD est composé de 60 % de glucides, de 16,1 % de protéines et 3,1% de lipides. Ce régime est référencé A04 chez la société SAFE ®. Le régime HFHS, élaboré par l'institut national de la recherche agronomique (INRA), est composé de 35% de glucides, 19,8 % de protéines, 36,1% de lipides et les lipides sont apportés par du beurre laitier Lactalys ®. Les animaux ont accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture.

La composition détaillée des acides gras pour chaque régime est présentée dans la Table 17. Les acides gras sont majoritairement saturés au sein du régime HFHS et majoritairement monoinsaturés au sein de régime STD.

			Régime alimentaire	
Nomenclature			HFHS (%)	STD (%)
Acides gras saturés	Acide caprylique	C8 :0	1,6	0
	Acide caprique	C10 :10	2,2	0
	Acide myristique	C14 :0	10,4	0,49
	Acide palmitique	C16 :0	31,1	19,1
	Acide stéarique	C18 :0	36,7	17,2
	Total		<b>82</b>	<b>36,79</b>
Acides gras monoinsaturés	Acide oléique	C18 :1	<b>16,5</b>	<b>51,3</b>
Acides gras	Acide linoléique	C18 :2	<b>0,3</b>	<b>6,3</b>

Table 17 : Composition lipidique des deux régimes alimentaires imposés aux souris de l'étude : régime alimentaire standard (STD) et riche en graisses et en sucres (HFHS).

## 2.2 Population

Quarante-quatre souris ont été considérées pour cette étude. Afin de pouvoir évaluer l'influence du régime alimentaire sur la quantité et la composition lipidique hépatique chez un modèle animal de glycogénose et chez des contrôles, quatre groupes d'animaux ont été constituées (Table 18):

- Groupe 'L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS': constitué de 12 souris issues du modèle de glycogénose (souris L-G6pc<sup>-/-</sup>) nourries avec le régime alimentaire HFHS;
- Groupe 'L-G6pc<sup>-/-</sup> STD' : constitué de 15 souris issues du modèle de glycogénose (souris L-G6pc<sup>-/-</sup>) nourries avec le régime alimentaire STD;
- Groupe 'contrôle HFHS' : constitué de 11 souris contrôles nourries avec le régime alimentaire HFHS;
- Groupe 'contrôle STD' : constitué de 5 souris contrôles nourries avec le régime STD.

A 9 mois, les souris contrôles nourries avec le régime alimentaire hyperlipidique présentent les masses les plus élevées (Table 18).

Groupe	Taille du groupe	Masse (g) Moyenne ±SEM
L-G6pc <sup>-/-</sup> HFHS	12	30,0±0,8
L-G6pc <sup>-/-</sup> STD	15	26,9±0,6
Contrôle HFHS	12	40,0±1,7
Contrôle STD	5	25,8±0,4

Table 18 : Tailles des quatre groupes d'animaux qui ont été considérés pour l'étude. La masse moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) correspondante ont été évaluées pour chacun des groupes. L'erreur standard de la moyenne d'une population est égale à son écart type divisé par la racine carrée de l'effectif.

**Remarque :** Bien que soixante-cinq souris ont initialement été recrutées pour l'étude, seules quarante-quatre souris ont été maintenues dans l'étude, vingt-et-une souris ayant été exclues à différentes étapes du protocole (acquisition, quantification). Ainsi pour le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS : une souris est morte lors de l'acquisition, trois souris ont été écartées suite à des erreurs d'acquisition et une souris n'a pas pris de poids. Quinze souris ont été exclues (groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD (cinq souris), groupe contrôle HFHS (cinq souris), groupe contrôle STD (cinq souris) en raison des valeurs aberrantes des profils lipidiques

estimés par rapport à leurs groupes respectifs liées souvent à des acquisitions réalisées avec une mauvaise correction des inhomogénéités de champ induisant des largeurs de raie de l'eau supérieures à 60 Hz.

## **B. Méthode**

### **1. La spectroscopie localisée**

#### **1.1 Les champs magnétiques considérés**

Les expérimentations ont été réalisées avec un imageur Biospec BRUKER 4,7 T horizontal (Bruker, Ettlingen, Germany) pour les études *in vitro* sur l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate. Les spectres de l'huile de tournesol et de l'étude *in vivo* ont été acquis avec un imageur Biospec BRUKER 7 T horizontal ((Bruker, Ettlingen, Germany). Dans les deux cas, une antenne en quadrature qui fonctionne en émission-réception, d'un diamètre intérieur de 32 mm (Rapid Biomedical, Würzburg, Germany), adaptée au champ, a été utilisée.

Les spectres acquis à 4,7T sont le sont trois fois, à plusieurs jours d'intervalles, afin de vérifier la répétabilité des mesures. Le coefficient de variation sera calculé comme

$$CV = \frac{\text{écart - type}}{\text{moyenne}} * 100$$

étant :

#### **1.2 Les séquences d'acquisition**

L'hétérogénéité des tissus biologiques nécessite une localisation spatiale en spectroscopie *in vivo*. La taille et la position du volume d'intérêt (VOI : Volume Of Interest) sont définies à partir d'images anatomiques collectées par imagerie par résonance magnétique. Afin de réduire la contamination du volume d'intérêt par des signaux provenant de l'extérieur du volume, l'ajout de bandes de saturation (Outer Volume Suppression) peut s'avérer nécessaire. Deux techniques d'acquisition monovoxel sont les plus utilisées *in vivo*, utilisant les échos de spin ou les échos stimulés respectivement la séquence PRESS (Point RESolved Spectroscopy) (Bottomley, 1987) et la séquence STEAM (STimulated Echo Acquisition Method)(Frahm et al., 1989).

##### **1.2.1 Séquence PRESS (Point RESolved Spectroscopy)**

Cette séquence consiste en une application d'une impulsion d'excitation de 90° et de deux impulsions de refocalisation de 180° (Figure 28)(Bottomley, 1987). Le temps de répétition est le temps qui sépare deux impulsions de 90°. Un premier écho est formé au temps TE1, suite à l'application de la première impulsion de 180°. La seconde impulsion de 180° refocalise celui-ci pendant le temps TE2, et l'écho final est formé au bout du temps d'écho (TE) tel que TE=TE1+TE2. Chacune des impulsions est accompagnée de gradient de sélection de coupes, qui permet de sélectionner un voxel. L'écho provient du cube que forme l'intersection des trois coupes, mais dans la pratique, seule la moitié de cet écho est acquise, car l'application du dernier gradient détruit la première moitié. Pour les longs TE,



l'écho entier peut être acquis et donner un meilleur rapport signal sur bruit. Nous avons affaire à un double écho de spin.

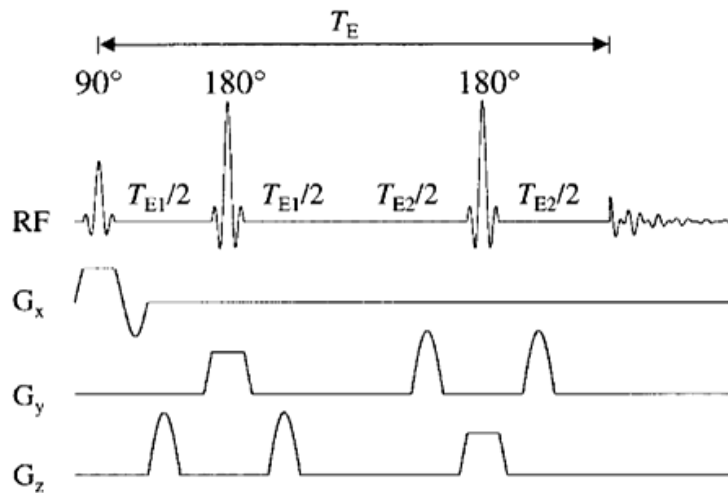


Figure 28 : Chronogramme de la séquence PRESS.

Le profil de tranche est toujours imparfait. Ces imperfections produisent des composantes transversales (ordres de cohérence) qui peuvent contaminer le signal du second écho. Des gradients de brouillage sont donc placés de part et d'autre des impulsions sélectives de 180°, selon des axes orthogonaux, ce qui permet de détruire ces cohérences. Une optimisation du chronogramme pour les temps d'écho TE1 et TE2 peut être nécessaire, notamment pour les métabolites qui peuvent se superposer. La PRESS convient à l'observation des métabolites à T1 longs, mais est sensible aux effets du couplage J.

### 1.2.2 Séquence STEAM : STimulation Echoes Acquisition Method

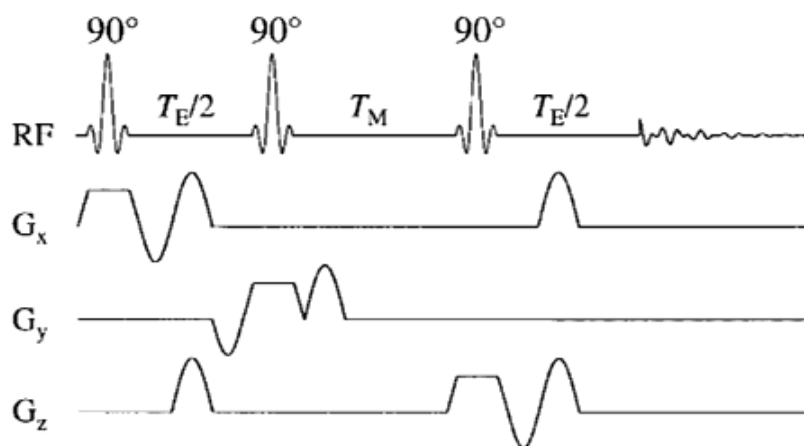


Figure 29 : Chronogramme de la séquence de STEAM ( $T_M$  : temps de mélange).

La séquence d'acquisition par échos stimulés consiste en la succession de trois impulsions de 90° appliquées en présence de 3 gradients orthogonaux (Figure 29)(Frahm

et al., 1989). La sélection du volume est proche de celle utilisée par la séquence PRESS. La première impulsion de 90° produit une magnétisation transverse. D'abord en phase juste après l'excitation, les spins se déphasent rapidement. Une seconde impulsion de 90° est appliquée après un temps TE/2, qui bascule les spins déphasés du plan XY dans le plan ZY. Avant l'application de la troisième impulsion, les composantes de la magnétisation ne relaxent que longitudinalement pendant un temps appelé temps de mélange (TM). Après l'application de la troisième impulsion, la magnétisation restante est rebasculée dans le plan transverse. Cette séquence entraîne la création de plusieurs échos mais seul l'écho situé à la date TE/2 après la dernière impulsion est acquis (écho stimulé). Les autres échos (obtenus aux temps TM, TE/2-TM, TE/2+TM) sont éliminés par l'application de gradients de brouillage appliqués après chacune des impulsions.

L'avantage de la STEAM par rapport à la PRESS est le temps d'écho minimal qu'elle peut atteindre, mais cette séquence présente un rapport signal sur bruit plus faible. En effet, la séquence PRESS permet d'obtenir un signal d'écho maximal contrairement à la séquence STEAM car seulement la moitié de l'aimantation se manifeste lors d'échos stimulés. La séquence STEAM ne nécessite pas d'impulsions de 180°, ce qui limite la puissance des impulsions radiofréquence à appliquer.

D'autres séquences de localisation existent comme la séquence ISIS (Ordidge et al., 1986), mais qui est plus adaptée à la spectroscopie du phosphore ou la séquence LASER (Garwood and DelaBarre, 2001).

Au cours de notre étude, obtenir le meilleur rapport signal-sur-bruit par unité de temps a été prioritaire. Ainsi, la séquence PRESS est choisie car elle permet d'acquérir plus de signal que la séquence STEAM.

### 1.3 Suppression du signal de l'eau

La suppression du signal de l'eau *in vivo* permet de faire apparaître les métabolites qui pourraient être masqué par son intensité trop importante. Celle-ci peut être exercée en amont des séquences d'excitation, en saturant la fréquence de l'eau (une impulsion avec une bande de fréquence englobant celle de l'eau est choisie, de manière à ne pas endommager les autres résonances), suivi d'un gradient de brouillage. Ce gradient est nécessaire pour détruire le signal que produirait l'impulsion de saturation de l'eau.

Plusieurs techniques de saturation ou de suppression du signal de l'eau existent. Nous pouvons citer VAPOR (Tkac et al., 1999), CHESS (Haase et al., 1985), SWAMP (de Graaf and Nicolay, 1998). Pour les études par spectroscopie *in vivo* dans le foie, la suppression du signal de l'eau n'est pas réalisée de façon systématique (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) comme cela peut être fait pour les études dans le cerveau. Ceci s'explique par le fait que de nombreuses équipes se sont intéressées uniquement à l'information traitant de la quantité lipidique plutôt que de la composition fine de la structure des lipides. L'information sur la quantité lipidique totale est obtenue par la mesure de l'intensité de la composante fréquentielle à 1.3ppm. Cette estimation n'est pas détériorée par la présence du signal de l'eau.

Pour notre étude, la méthode VAPOR a été choisie.

#### 1.4 Choix des paramètres d'acquisition de la séquence PRESS

1.5 Les résonances lipidiques présentent un T2 relativement court (< 80ms) (

Table 27). Ainsi, pour avoir le meilleur rapport signal sur bruit, un temps d'écho court (TE=16 ms) est privilégié. La taille du voxel choisie est de 27 mm<sup>3</sup> *in vivo*, adapté à la morphologie du foie de la souris. Cette taille est conservée pour les expériences *in vitro*. Pour les expériences *in vitro*, le TR est fixé à 5000 ms tandis que pour les acquisitions *in vivo*, le TR est synchronisé sur la respiration et ajusté de manière à être supérieur à 3000 ms. Nous avons considéré qu'à ces TR, les effets T1 étaient minimes. Les paramètres d'acquisition de la séquence PRESS sont détaillés ci-après pour les deux champs.

Pour les acquisitions *in vitro* à 4,7 T:

- Bande spectrale de 4000 Hz ;
- 2048 ou 4096 points de données ;
- 128 à 256 nombres d'accumulations ;
- TE=16 ms ;
- TR=5000 ms.

Pour les acquisitions *in vitro* et *in vivo* à 7 T:

- Bande spectrale de 4000 Hz ;
- 2048 points de données ;
- 7 nombres d'accumulations pour les spectres sans suppression d'eau, 128 nombres d'accumulations pour les spectres avec suppression d'eau ;
- TE=16 ms ;
- TR=5000 ms (*in vitro*), TR>3000 ms (*in vivo*).

#### 1.6 Stratégies et paramètres d'acquisition influençant la qualité du spectre

La qualité d'un spectre ainsi que sa quantification repose énormément sur la qualité de son acquisition. Kreis, 2004 a détaillé les principaux artefacts qui peuvent affecter un signal de spectroscopie. Parmi ces artefacts, nous pouvons citer :

- les artefacts liés aux mouvements ;
- les artefacts liés aux courants de Foucault ;
- les artefacts de déplacement chimique ;
- les artefacts induits par une mauvaise sélection de coupes ;
- la contamination du signal par des signaux parasites.

Certains de ces artefacts sont apparus au cours des acquisitions et certaines stratégies de corrections ont du être mises en place.

### 1.6.1 Ajustements des gradients de brouillage de la PRESS à 4,7 T

Au cours de ce travail de thèse, un problème de phase était récurrent sur les spectres *in vitro* à 4,7T. L'origine de ce problème a pu être identifiée. La séquence PRESS choisie pour les expérimentations (Figure 28) utilise des gradients de brouillage appliqués par paires de part et d'autre des impulsions RF sélectives de 180° et orientés de façon à déphaser toutes les cohérences indésirables provenant de protons en dehors du volume sélectionné. Ainsi, deux gradients de brouillage interviennent autour de la deuxième impulsion et de la troisième impulsion de 180°. Si ces gradients de brouillage sont mal équilibrés (non symétriques), ou parce qu'ils sont mal ajustés, le maximum de l'écho est déplacé et n'est plus au centre de la fenêtre d'acquisition, ce qui laisse apparaître une phase d'ordre 1. Pour corriger ce problème de phase, une série d'acquisitions a été réalisée. Ont été évalués :

- La durée des gradients de brouillage (« spoiler duration ») : cette durée intervient sur la sélection du voxel
- La puissance des gradients de brouillage (« spoiler strength »), qui peut induire des problèmes de courants de Foucault, si trop élevée.

Au terme des tests réalisés, il a été constaté qu'une durée minimale et un ajustement manuel de la puissance des gradients de brouillage permettaient de supprimer le problème de phase.

Pour les acquisitions *in vitro*, ces gradients de brouillage ont été réglés de manière manuelle avant chaque acquisition sur la machine 4,7 T. Le problème n'était pas présent sur l'imageur à 7T car les gradients sont assez puissants et le système de pré-échantillonnage compense bien la commutation des gradients.

### 1.6.2 Choix de la méthode de « shim »

Une mauvaise homogénéité du champ magnétique influence la résolution du spectre. Une meilleure résolution permet de mieux identifier les résonances, notamment sur les spectres avec suppression d'eau. Améliorer l'homogénéité du champ magnétique (« shimmer ») peut être réalisée avec plusieurs techniques, automatiques ou manuelles. Les méthodes itératives de calcul des gradients de shim présentes sur l'imageur Bruker : FASTMAP (Gruetter, 1993), MAPSHIM (Manabe, 1994), ont été comparées avec une méthode manuelle. Cette comparaison est réalisée grâce au calcul de la largeur à mi-hauteur (Table 19) de la résonance la plus élevée. Dans notre exemple, il s'agira de la raie qui résonne à 1,3 ppm.

La correction manuelle consiste à faire varier les courants dans les bobines de « shim » du premier et du second ordre. Dans le domaine temporel, il s'agira d'avoir un signal le moins amorti possible et dans le domaine fréquentiel, un maximum d'intensité pour le pic le plus important (*in vivo*, il s'agit de la résonance de l'eau).

Les acquisitions ont été réalisées deux fois avec un fantôme de trioléate, à différents temps, avec une séquence PRESS.

Technique	Largeur de raie (Hz)
FASTMAP	14,70 ± 0
MAPSHIM	19,80 ± 4,52
Correction des gradients de shim des ordres 1 et 2	13,20 ± 0,70

Table 19 : Comparaison des différentes méthodes pour améliorer l'homogénéité du champ (PRESS : TE/TR : 16/1000 ms) selon la largeur de raie du pic le plus important (1,3 ppm) sur un fantôme de trioléate à 4,7T. La correction manuelle donne le meilleur résultat pour la largeur de raie par rapport aux autres méthodes.

La meilleure performance de la correction manuelle des gradients de shim peut s'expliquer par la nature de l'échantillon, puisque les techniques automatiques disponibles sur la machine sont optimisées pour l'eau. Notre étude se basant sur les lipides, une correction manuelle des gradients de shim pour les expériences *in vitro* et *in vivo* a été adoptée dans ce travail.

Dans les études réalisées au cours du travail de cette thèse, un seuil de réjection des largeurs à mi-hauteur est défini afin de s'assurer d'une qualité minimale de la résolution fréquentielle des spectres. Ce seuil est de 60 Hz pour les expériences *in vivo* à 7T.

### 1.7 Synchronisation des acquisitions

Les acquisitions de spectroscopie ont été synchronisées sur la respiration de l'animal, selon une méthode mise au point au laboratoire, afin d'acquérir le signal toujours au même moment du cycle de la respiration et ainsi d'obtenir une amplitude et une phase optimales pour le signal moyenné. Une absence de synchronisation induit une mauvaise estimation des amplitudes (Garbow et al., 2004). Dans la phase de mise au point, le déclenchement des acquisitions est ajusté manuellement de manière à placer la fenêtre d'acquisition pendant la phase de fin d'expiration du cycle respiratoire : le générateur impose ensuite un délai entre deux impulsions de synchronisation (Figure 30).

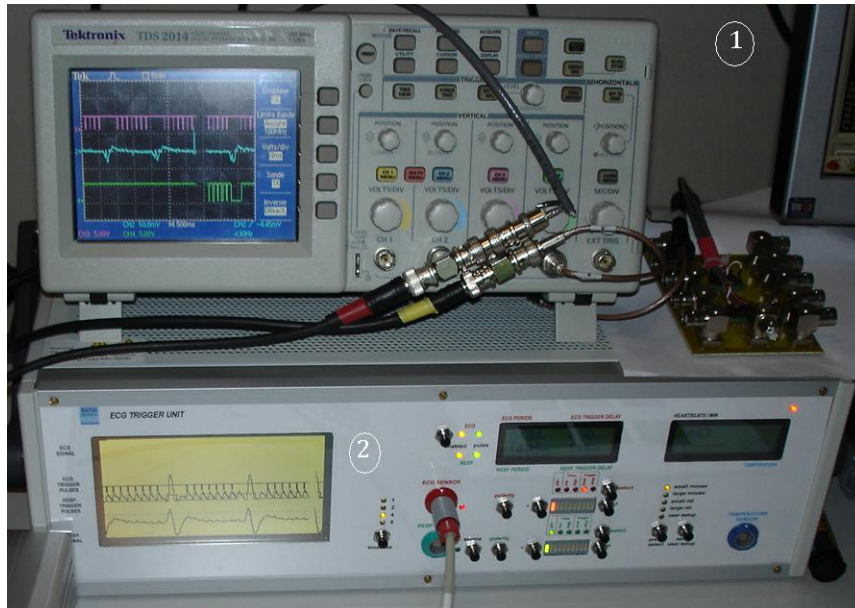


Figure 30 : Illustration de la synchronisation GBF (1) (Générateur de basses fréquences) : générateur du signal de déclenchement, l'unité de synchronisation (2) qui enregistre les signaux respiratoire via un capteur pneumatique.

Le signal de respiration de la souris est recueilli à l'aide d'un capteur pneumatique. Lors des acquisitions de spectroscopie, un délai de 3 secondes est imposé grâce au générateur de signaux afin d'avoir un temps de répétition effectif supérieur à 3 secondes.

La Table 10 récapitule les conditions d'acquisition des signaux de SRM mesurés *in vivo* dans le foie chez le petit animal.

Auteur	Modèle	Espèce	Champ Tesla	Synchronisation respiratoire	Séquence TE/TR /NA	Taille du voxel (mm <sup>3</sup> )	Suppression d'eau
Foley et al., 2001	hepatocarcinome	Rat	7	oui	STEAM 24/-/512	125	CHESS
Towner et al., 2002	hepatotoxicité	Rat	7	-	STEAM 15/1500/-	216	CHESS
Garbow et al., 2004	<i>apoB 38.9</i> modèle de foie gras	Souris	4,7	oui	LASER 30/1500/-	48	-
Calderan et al., 2006	<i>Ob/ob</i>	Souris	4,7	-	STEAM 22/2500/ 128	27	-
Delgado et al., 2009	Régime hyper lipidique	Rat	7	-	PRESS 28/1000/ 128	125	-
Lim et al., 2009	Régime hyperlipidique	Rat	3	-	p-PROBE 35/2000	100	-
Corbin et al., 2009	MCDD <i>ob/ob</i> + LPS	Souris	4,7	oui	PRESS 23/3000/ 256	32	CHESS
Marsman et al., 2010	MCDD	Rat	3	-	PRESS 35/2000/ 64	120	-
lee et al., 2010	<i>Ob/ob</i>	Souris	4,7	-	STEAM 144/2500 /64	27	-
van Werven et al., 2011	MCDD	Rat	3	non	PRESS 35/2000/ 64	120	Oui
Cheung et al., 2011	CDCL4 Modèle de fibrose	Rat	7	oui	PRESS 15/2000- 2500/256	125	VAPOR
Ciapaite et al., 2011	Régime hyper lipidique	Rat	6,3	-	LASER 16/1000/ 32	8	SWAMP
Peng et al., 2011	<i>Ob/ob</i>	Souris	7	-	PRESS 20/2500/ 128	27	-
Ye et al., 2011	<i>Ob/ob</i>	Souris	9,4	-	PRESS 12 /6000/ 40	27	VAPOR
Notre étude	<i>L-G6pc<sup>-/-</sup></i>	Souris	7	oui	PRESS 16/3000/ 128	27	VAPOR

Table 20 : Synthèse bibliographique des paramètres d'acquisition utilisés dans les études de spectroscopie chez la souris et le rat. (p-PROBE : équivalent de la séquence PRESS sur les machines GE Medical System). LPS : Lipopolysaccharide

## 1.8 Déroulement du protocole *in vivo*

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane 5% dans de l'air lors de l'induction puis fixé à 1,5%-2% pendant les acquisitions. La température corporelle est maintenue à 37°C par un système de circulation d'eau. Un capteur pneumatique a été utilisé pour mesurer le cycle respiratoire. Trois séquences d'imagerie afin de bien localiser le foie et pour s'assurer du bon positionnement du voxel de spectroscopie sont d'abord réalisées. Puis deux signaux de spectroscopie à un TE=16 ms sont acquis, l'un sans et l'autre avec le module de suppression du signal de l'eau (VAPOR), pour une durée d'acquisition totale de 1min 30s pour le signal sans suppression d'eau et pour une durée d'acquisition de 7min pour le signal avec suppression d'eau. Plusieurs signaux sans suppression d'eau à différents TE (21, 26, 31, 36, 100 ms) sont également acquis permettant une étude sur les temps de relaxation transversaux (T2) des groupements.

La durée totale de réalisation du protocole est d'environ 1h. Cette durée comprend l'anesthésie de la souris, son installation dans l'aimant, le protocole d'imagerie et le protocole de spectroscopie.

Une semaine après les acquisitions en RMN, les animaux sont euthanasiés par dislocation cervicale. Le prélèvement du foie est réalisé rapidement par «freeze clamping» à la température de l'azote liquide (-196°C) pour les analyses biochimiques. Ensuite, le foie est rincé deux fois dans du tampon phosphate salin (PBS) puis conservé à -80°C.

## 1.9 Prétraitement des signaux

Plusieurs pré-traitements peuvent être nécessaires pour corriger les imperfections après l'acquisition du signal (mauvaise excitation des coupes du voxel, inhomogénéités des impulsions radiofréquences, contamination du signal par le volume extérieur etc). Nous pouvons citer :

- le « zéro-filling » : interpolation des points dans le domaine temporel avec des zéros pour améliorer la résolution digitale pour la visualisation.
- la correction de phase d'ordre 0 et/ou d'ordre 1.

Ces déphasages surviennent lors de l'acquisition et peuvent dépendre (phase d'ordre 1) ou non (phase d'ordre 0) de la fréquence.

- l'apodisation, qui consiste à multiplier dans le domaine temporel le signal avec une fonction connue. Il s'agit d'appliquer un fenêtrage. Cette fonction peut être une exponentielle décroissante. Cette opération est appliquée par exemple pour réduire le bruit ou améliorer la résolution fréquentielle, mais également pour atténuer ou supprimer certains artefacts dans le domaine fréquentiel.
- la correction de la ligne de base par suppression des premiers points.



Dans notre cas, une correction des phases d'ordre 0 et/ou d'ordre 1 a été réalisée pour chaque spectre *in vivo* et *in vitro*. Pour ces derniers, une apodisation gaussienne de 7 à 40 Hz a été appliquée, pour les spectres qui le nécessitaient afin de réduire les problèmes de phase liés aux modulations du couplage J.

### 1.10 Méthodes de quantification

La SRM *in vivo* est une technique quantitative. Le signal de précession libre, acquis dans le domaine temporel, est considéré comme une somme de sinusoïdes décroissantes dont l'enveloppe est généralement décrite selon une fonction gaussienne, lorentzienne ou voigt. L'intensité d'une composante fréquentielle du signal de précession libre dans le domaine temporel, correspondant à la surface de la résonance dans le domaine fréquentiel, est proportionnelle au nombre de protons équivalents résonnants à la fréquence sélectionnée.

Ce signal peut s'écrire :

$$s(t) = \sum_{k=1}^K a_k e^{j\phi_k} e^{(-d_k - j2\pi f_k)t_n} + n(t) \quad (\text{Équation 1})$$

Où :  $K$  représente le nombre de résonances composant le spectre ou le nombre de composantes fréquentielles constituant le signal de précession libre. Le signal de précession libre est modélisé par un somme de composantes fréquentielles et d'un bruit gaussien  $n(t)$ . Chaque composante fréquentielle  $k$  ( $1 \leq k \leq K$ ) est caractérisée une fréquence ( $f_k$ ), une amplitude ( $a_k$ ), un facteur d'amortissement ( $d_k$ ), et une phase d'ordre 0 ( $\phi_k$ ).

Les méthodes de quantification, travaillant dans le domaine temporel, ont pour but d'estimer chacun des paramètres, au maximum un nombre  $4K$  de paramètres.

Pour représenter le spectre dans le domaine fréquentiel, une transformation de Fourier est appliquée au signal. Les méthodes de quantification dite « du domaine fréquentiel » réaliseront leur estimation sur une fonction modèle paramétrée décrivant non plus le signal de précession libre mais le spectre. La Table 21 présente les différents paramètres dans les deux domaines de quantification.

Paramètre	Domaine temporel	Domaine fréquentiel
$a_k$	Amplitude	Aire du pic
$d_k$	Facteur d'amortissement	Largeur de raie
$f_k$	Fréquence	Position du pic sur l'axe des fréquences
$\phi_k$	Phase	Phase de la raie

Table 21 : Relation entre les paramètres dans le domaine temporel et le domaine fréquentiel.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour estimer l'intensité des composantes fréquentielles du signal de précession libre:

- l'intégration des résonances dans le domaine fréquentiel ;
- les méthodes de quantification automatique fondée sur l'estimation de paramètres par moindres carrés non linéaire utilisant une fonction modèle dans le domaine temporel ou dans le domaine fréquentiel. Nous pouvons citer ici les méthodes AMARES (Vanhamme et al., 1997), QUEST (Ratiney et al., 2005), LCMODEL (Provencher, 1993), AQSES (Pouillet et al., 2007) et également les méthodes mises à disposition par les constructeurs sur les consoles des imageurs. Nous présentons les deux méthodes les plus utilisées dans la littérature dans le cadre de la spectroscopie du foie.

#### 1.10.1 AMARES : quantification des signaux dans le domaine temporel

La méthode AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectra fitting) est une méthode interactive de minimisation non linéaire avec introduction de connaissances *a priori*. Elle est disponible sur le logiciel Jmrui.

Pour cet algorithme, l'équation 1 décrivant le signal devient :

$$s(t) = \sum_{k=1}^K a_k e^{j\phi_k} e^{-d_k(1-g_k+g_k t_n)t_n - j2\pi f_k t_n} e^{j2\pi f_k t_n} + n(t) \quad (\text{Équation } 2)$$

La fonction modèle associée peut être lorentzienne ( $g_k=0$ ) ou gaussienne ( $g_k=1$ ). Les valeurs de départ (facteurs d'amortissement et fréquences) sont données par l'utilisateur. Certaines valeurs de paramètres peuvent être connues et fixées *a priori* ou peuvent être contraintes lors de l'optimisation. Par exemple : les rapports entre paramètres peuvent être connus ou les fréquences relatives entre 2 raies peuvent être fixées (couplage J, déplacements chimiques).

Pour s'assurer de la fiabilité de la quantification, les bornes inférieures des Cramér-Rao (CRBs) (i.e la limite inférieure des variances associées aux paramètres estimés, voir 1.10.4) sont calculées pour chaque paramètre.

### 1.10.2 LC Model : méthode de quantification des signaux dans le domaine fréquentiel

LCModel (ou Linear Combination of Model) modélise la partie réelle du spectre, en utilisant une combinaison linéaire de métabolites, de lipides et de macromolécules ainsi que des splines pour la ligne de base.

La fonction modèle s'écrit :

$$\hat{Y}(v_k) = e^{-i(\phi_0 + v_k \phi_1)} \left[ \sum_{j=1}^{N_B} \beta_j B_j(v_k) + \sum_{l=1}^{N_M} C_l \cdot \sum_{n=-N_s}^{N_s} S_n M_l(v_{k-n}, \delta_l, \varepsilon_l) \right] \quad (\text{Équation 3})$$

Avec les contraintes :  $C_l \geq 0$ ,  $\delta_l \geq 0$ ,  $\sum_{n=-N_s}^{N_s} S_n = 1$

Où  $e^{-i(\phi_0 + v_k \phi_1)}$  correspond aux corrections de phase d'ordre 0 et d'ordre 1 ;

$\sum_{j=1}^{N_B} \beta_j B_j(v_k)$  désigne la modélisation de la ligne de base par les splines ;

$\sum_{n=-N_s}^{N_s} S_n M_l(v_{k-n}, \delta_l, \varepsilon_l)$  représente la convolution des spectres des métabolites par une

forme de raie tenant compte des distorsions du spectre acquis *in vivo*.

$N_B, N_M$  et  $2x N_s + 1$  correspondent aux nombres de fonctions splines, de métabolites et de points utilisés pour la convolution par une forme de raie.

Les bornes inférieures de Cramèr Rao sont également calculées par ce logiciel.

### 1.10.3 L'algorithme « Multiple Starting Value »

Alors que les méthodes de quantification pour la spectroscopie du cerveau ont fait l'objet de nombreux développements, elles apparaissent peu adaptées aux signaux du foie. Les spectres proton du foie, présentent des raies larges et peu résolues du fait de l'hétérogénéité des tissus et des inhomogénéités du champ magnétique. Les raies sont en majorité l'expression des multiplets issus des chaînes d'acides gras, à cela s'ajoute

l'enchevêtrement d'autres faibles contributions de métabolites (composés de choline, glucose, glycogène etc...). Ainsi, des méthodes d'estimation de formes de raies de type Voigt, qui sont des formes de raies combinant la forme lorentzienne et la forme gaussienne et qui sont donc plus générales ont dû être développées. Or la répartition entre la part gaussienne et la part lorentzienne dans la forme de raie n'est pas connue a priori et rend l'estimation, par un algorithme de moindres carrés, des formes de raie Voigt, très sensible aux valeurs de départ des paramètres de la fonction modèle employée. Une approche par tirages stochastiques des valeurs initiales et des contraintes douces (méthode Multiple Starting Values MSV) a été employée dans le cadre de cette thèse pour réduire les possibilités de convergence de l'algorithme de moindres carrés dans des minima locaux, et réduire les erreurs d'estimations.

#### (a) Principe

L'algorithme de quantification, baptisé Multiple Starting Value(MSV) (Ratiney et al., 2008), développé au laboratoire, modélise le signal de SRM dans le domaine temporel. Il est basé sur une optimisation non linéaire au sens des moindres carrés (Levenberg-Marquart), associé à une fonction modèle dit de type Voigt. Le choix de la forme de raie Voigt (Cavassila et al., 2009) pour les spectres acquis dans le foie s'est avérée plus adapté que les formes de raie Lorentzienne ou Gaussienne couramment utilisées, via la méthode AMARES, dans la littérature (Lundbom et al., 2010). Ce programme a été implémenté sous Matlab 7.4.

L'équation du signal s'écrit:

$$\hat{y} = \exp(i\phi_0) \sum_{k=1}^K a_k \exp(\alpha_k t_n + \beta_k^2 t_n^2 + i2\pi f_k t_n),$$

$$n=0 \dots N_d-1, i^2 = -1$$

$N_d$  : nombre de points

Les paramètres sont présentés à la Table 22.

La procédure tend à minimiser la fonction de coût suivante :

$$\chi^2 = \sum_{n=0}^{N_d-1} (y_n - \hat{y}_n)^2 \quad (\text{Équation 4})$$

Où  $y_n$  est le signal mesuré,  $\hat{y}_n$  le signal estimé.

Cette méthode va faire varier de façon aléatoire les valeurs de départ des facteurs d'amortissement lorentzien et gaussien ainsi que les bornes supérieures des intervalles autorisés pour leurs estimations.

<b>Table des symboles</b>	
$K$	nombre de composantes
$a$	amplitude proportionnelle au nombre de protons qui résonnent à la fréquence $f$ .
$f$	fréquence décrivant chaque groupement de la molécule (déplacement chimique)
$\alpha, \beta$	facteurs d'amortissement lorentzien et gaussien
$\Phi_0$	phase d'ordre 0
$t_n = nt_s + t_0$	Temps d'échantillonnage, $t_0$ : temps mort du receptr, $t_s$ : intervalle d'échantillonnage

Table 22 : Paramètres de la fonction modèle utilisés dans la méthode MSV.

- Les valeurs initiales

Les valeurs initiales de l'amplitude sont déterminées à partir de la résolution par moindres carrés d'un système linéaire en fixant les paramètres non linéaires (fréquences ; phases, facteur d'amortissements) à leurs valeurs de départ. Les fréquences de départ sont fournies par l'utilisateur. Un facteur d'amortissement global, permettant de définir des valeurs de départ pour les facteurs d'amortissement lorentzien et gaussien, est ensuite calculé à partir de chacune des fréquences. Ce facteur d'amortissement global est calculé à partir de la largeur à mi-hauteur (LMH) et est présumé être la moyenne des facteurs d'amortissement gaussien et lorentzien théorique, sans connaître les proportions exactes de ces facteurs d'amortissement :

$$\gamma_{global,k} = \pi \frac{LMH}{2} \left(1 + \frac{1}{2\sqrt{\ln 2}}\right) \approx \alpha_k + \beta_k \quad (\text{Équation 5})$$

Les fréquences sont contraintes dans un intervalle de  $\pm 10\text{Hz}$ , soit  $\pm 0,05\text{ ppm}$  à 4,7T.

$N_{tests}$  facteurs d'amortissement aléatoires  $\gamma_{global,k}$  pour chaque pic sont calculé selon une distribution uniforme dans un intervalle de  $\pm 30\%$  de la valeur  $\gamma_{global,k}$  initiale et les valeurs de départs pour les facteurs d'amortissement lorentzien  $Start_L$  et gaussien  $Start_G$  sont définis aléatoirement selon les relations suivantes :

$$\alpha_k = \lambda \gamma_{global,k}$$

$$\beta_k = (1 - \lambda) \gamma_{global,k}$$

où  $\lambda$  suit une loi de distribution uniforme sur l'intervalle  $[0,1]$ .

- Les intervalles de recherches

Les bornes supérieures des intervalles autorisés pour les facteurs d'amortissement lorentzien et gaussien sont incrémentées par pas de quelques dizaines de Hz (dans le cas des signaux *in vivo*, ce pas était de 50 Hz), jusqu'à une valeur maximale (*in vivo* : 350 Hz, *in vitro* : 200 Hz), définie empiriquement selon les propriétés du signal.

Plusieurs jeux de valeurs de départ et de contraintes sont ainsi disponibles. Plusieurs ajustements sont réalisés à partir de chacun de ces jeux de valeurs.

- Les solutions

Le résultat de quantification final est sélectionné parmi l'ensemble des solutions trouvées. Le critère de la fonction de coût minimum a été considéré pour sélectionner la solution finale. Une étude Monte Carlo a permis de comparer une quantification avec un seul jeu de valeurs de départs (SSV : Single Starting Values) et l'algorithme MSV sur un signal test reproduisant les résonances d'un spectre de foie acquis à 1,5T (Figure 31).

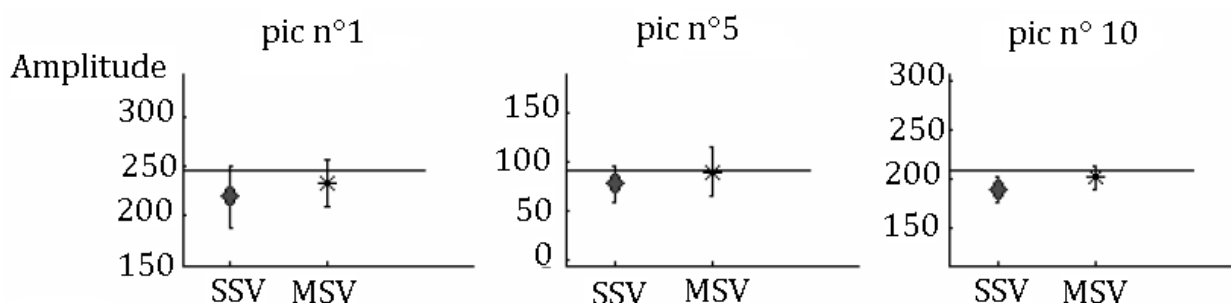


Figure 31 : Résultats des simulations Monte Carlo (moyenne et écart-type sur 50 signaux bruités) qui comparent l'utilisation d'un seul jeu de valeurs de départs et de contraintes et l'utilisation de l'algorithme MSV sur trois pics. Image tirée de Ratiney et al., 2008. La ligne horizontale représente la valeur exacte.

Ainsi, avec l'algorithme MSV, une meilleure précision ainsi qu'une réduction du biais sur l'estimation du paramètre amplitude est obtenue par rapport à la stratégie SSV.

Une étude menée au laboratoire (Duboc, 2008) a permis de déterminer la valeur optimale du tirage aléatoire  $N_{tests}$ . L'étude a été réalisée sur un signal simulé sans bruit et a permis de déterminer qu'au delà de 30 tirages aléatoires, la minimisation de la fonction de coût ne s'améliore plus. Cette valeur de 30 sera adoptée pour les quantifications au cours de ce travail de thèse.

Une partie de ce travail de thèse était de confirmer les hypothèses établies sur le nombre de composantes lors de la modélisation d'une raie.

Dans la suite, les résultats de la quantification seront souvent présentés sous forme de rapport entre les amplitudes estimées pour les résonances ou rapportés à l'intensité du signal de l'eau.

Une erreur d'estimation est calculée telle que  $\% \text{erreur} = \text{abs}\left(\frac{V_T - V_E}{V_T}\right) * 100$

avec  $V_T$  : valeur théorique       $V_E$  : valeur expérimentale

#### (b) Choix de la fonction modèle

De manière générale, une raie de résonance, pour un déplacement chimique donné, est modélisée par une composante. Mais le nombre de composantes doit s'adapter soit à la structure de la raie, quand il s'y prête (si par exemple, la résonance se présente en triplet, trois composantes seront choisies) soit pour pallier une asymétrie des raies.

La qualité et l'excellente résolution des spectres *in vitro* permettent de mettre en évidence la multiplicité de chaque raie. Afin de quantifier au mieux ces raies, cette multiplicité a été prise en compte lors du choix du nombre de fonctions modèles.

A titre d'exemple, la raie de 1,3 ppm sera présentée car cette raie est plus susceptible de présenter une asymétrie, due notamment à un mauvais ajustement des « shims ». Le nombre de composantes pour modéliser cette raie a été varié d'une à cinq. Les tests ont été effectués sur l'acide palmitique. Le spectre de l'acide palmitique est illustré à la Figure 32.

L'acide palmitique présente quatre résonances identifiées et présentées dans la Table 23.

Groupement	Déplacement chimique (ppm)	Multiplicité
Methyl (d)	0,9	Triplet
Methylene(c)	1,3-1,4	Multiplet
$\beta$ carboxylique (b)	1,6	Multiplet
$\alpha$ carboxylique(a)	2,4*	Multiplet

Table 23 : Déplacements chimiques des groupements chimiques de l'acide palmitique, \* résonance à 2,25 ppm chez les autres acides gras simples.

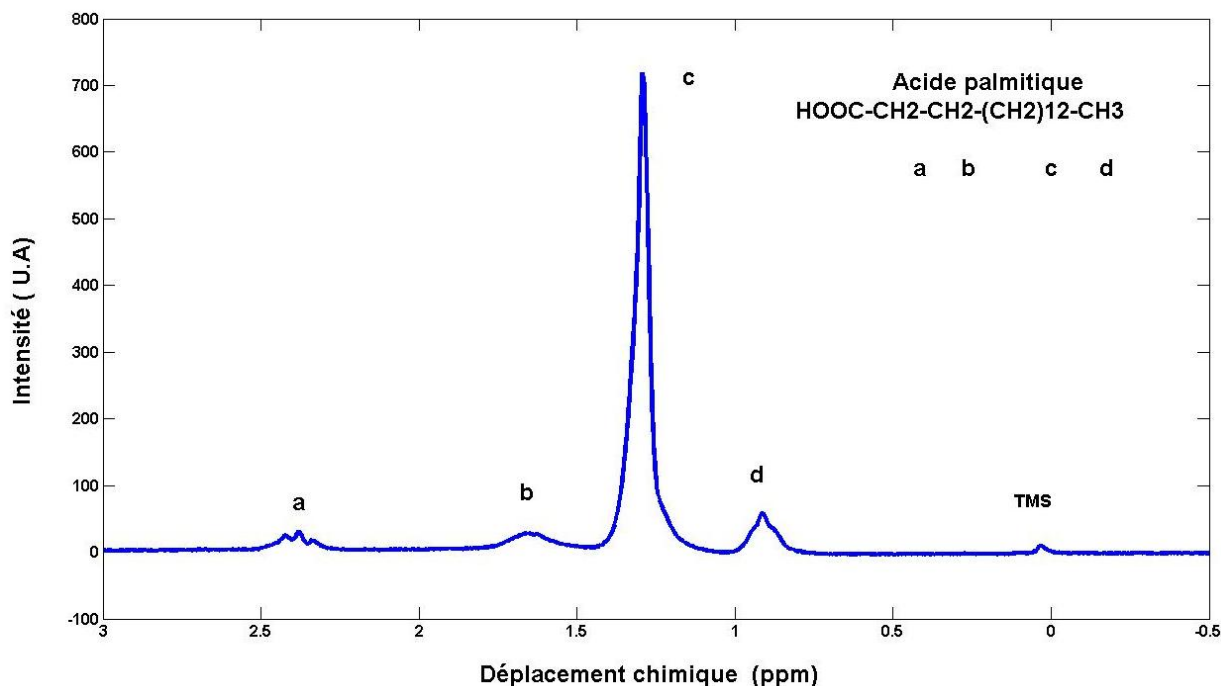


Figure 32 : Spectre  $^1\text{H}$  de l'acide palmitique (TE/TR : 16/5000 ms)( référence TMS à 0 ppm).

Le spectre issu de l'acquisition du couple TE/TR 16/5000 ms est considéré pour les différents tests. Le récapitulatif du nombre de composantes est présenté à la Table 24, chaque fréquence varie dans un intervalle de  $\pm 0,05$  ppm.

Nombre de composantes	Fréquences de départ (ppm)	Intervalles De Confiance (ppm)
1	1,29	[1,24-1,34]
3	1,29 ; 1,31 ; 1,35	[1,24-1,40]
5	1,23 ; 1,26 ; 1,29 ; 1,31 ; 1,35	[1,18-1,40]

Table 24 : Fréquences de départ selon le nombre de composantes choisies.

D'un point de vue qualitatif, les oscillations correspondant au résidu de la résonance 1,3 ppm s'atténuent en passant d'une composante (Figure 34-a) à cinq composantes (Figure 34-c). D'un point de vue quantitatif, la fonction de coût baisse de 91 % en passant d'une composante à cinq composantes. De plus, le rapport '1,3'/0,9' se rapproche de la valeur théorique au fur et à mesure que le nombre de composantes augmente (Figure 33). Aucune correction des temps de relaxation n'a été appliquée lors de cette comparaison. Cependant, en prenant en compte une valeur moyenne (à partir de mesures de T2 faites sur d'autres acides gras) de temps de relaxation pour les résonances 1,3 ppm et 0,9 ppm, les estimations se rapprochent considérablement de la valeur théorique.



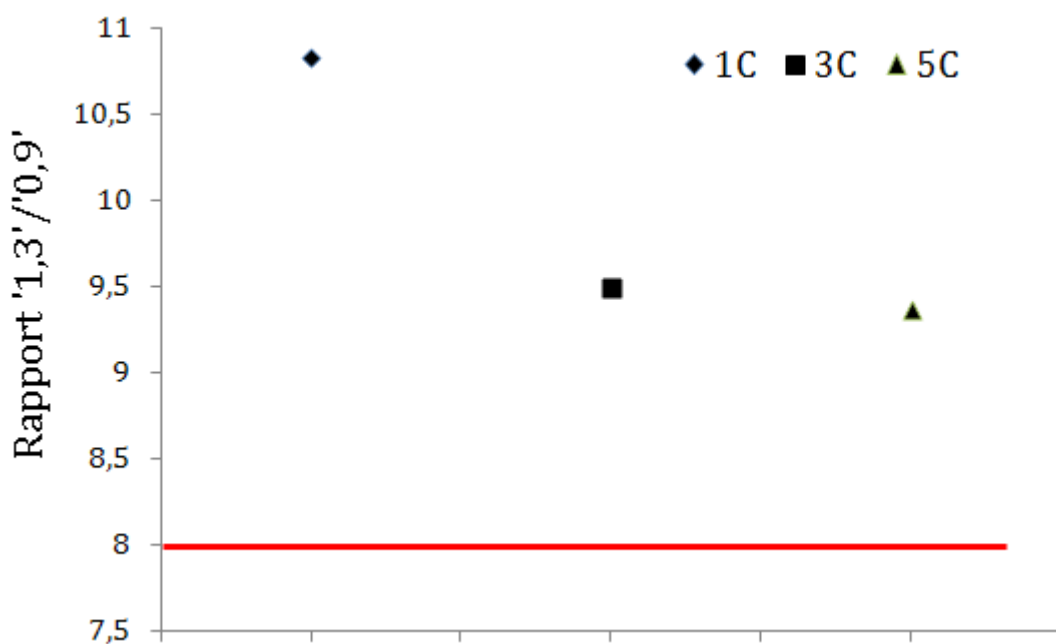
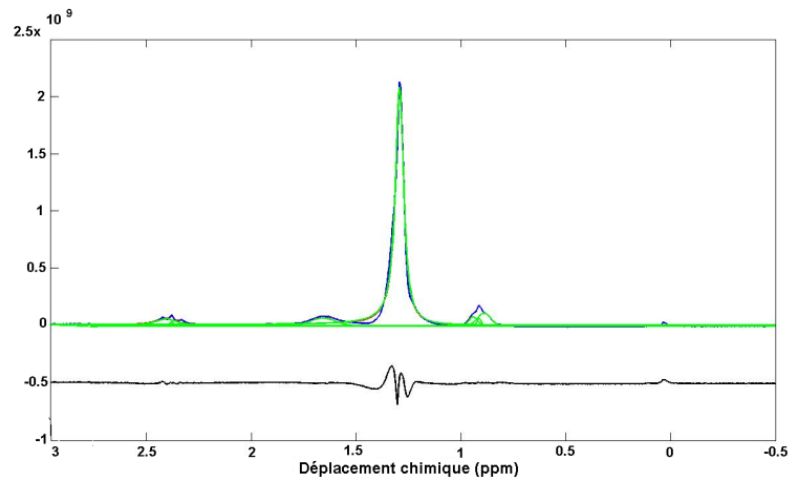


Figure 33 : Influence du nombre de composantes pour la résonance 1,3 ppm sur l'erreur d'estimation du rapport '1,3'/0,9' (1C : une composante, 3C : 3 composantes, 5C : 5 composantes). En rouge, la valeur théorique du rapport 1,3'/0,9'.

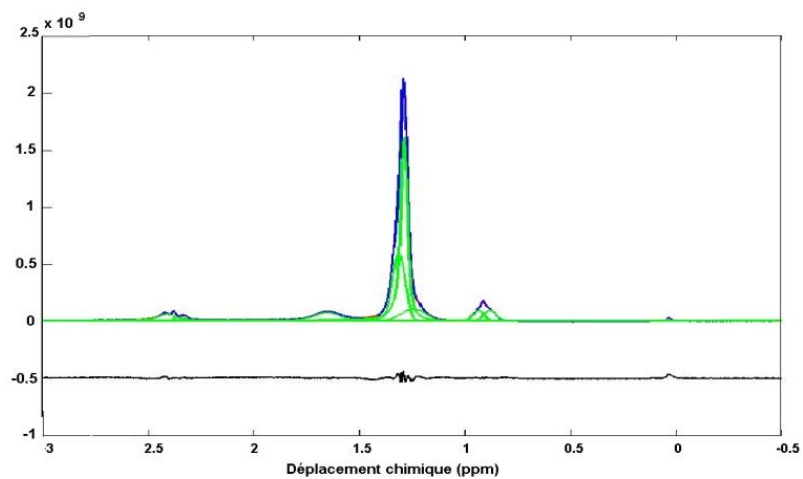
Dans la suite des quantifications, le nombre de composantes est adapté à la structure de la résonance pour les spectres *in vitro* acquis à 4,7 T. Le nombre de composantes choisi pour l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate pour chaque résonance est synthétisé à la Table 25.

A 7T, la résolution des spectres *in vivo et in vitro* ne permet pas d'identifier la multiplicité lors de la quantification. Néanmoins, une seule fonction Voigt permet de modéliser chaque raie, au vue de la qualité du résidu. Dans le cas de la raie de l'eau et de celle du groupement méthylène à 1,3 ppm, deux raies sont parfois appliquées pour prendre en compte l'asymétrie de ces raies dues aux effets de shim.

a)



b)



c)

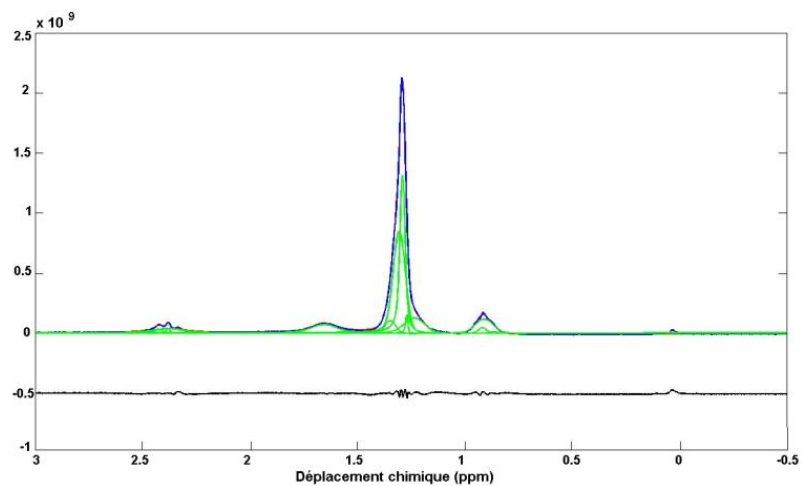


Figure 34 : Quantification d'un spectre d'acide palmitique (TE/TR : 16/5000 ms) avec (a) : une composante pour la résonance 1,3 ppm, (b) trois composantes pour la résonance 1,3 ppm et (c) cinq composantes pour la résonance 1,3 ppm. En vert : les composantes individuelles, en noir le résidu, en bleu le spectre original.

Déplacement chimique (ppm)	Acide oléique	Acide linoléique	Trioléate
5,3	3	3	3
5,2	RI	RI	1
4,29	RI	RI	4
4	RI	RI	4
2,8	RI	3	RI
2,25*	3	3	3
2	4	4	4
1,6	3	3	3
1,3	5	5	5
0,9	3	3	3

Table 25 : Nombre de composantes selon les résonances pour les différents échantillons, RI : Résonance Inexistante, \* résonance à 2,32 ppm pour le trioléate.

#### 1.10.4 Fiabilité de la quantification

Plusieurs manières permettent de s'assurer de la fiabilité de la quantification. Une première manière est d'observer le résidu. Une seconde manière consiste à faire appel à la théorie de Cramér-Rao (Cavassila et al., 2001). Elle permet d'estimer la limite inférieure des variances des paramètres estimés, si ces estimateurs sont supposés non biaisés, et si la seule source d'incertitude sur les mesures n'est attribuée qu'au bruit de mesure. Cette limite doit être prise comme un standard de précision permettant de qualifier la fiabilité que l'on peut avoir dans les résultats de quantification.

Les bornes inférieures de Cramér-Rao se calculent à partir d'une inversion de la matrice d'information de Fisher calculée à partir des dérivées partielles de la fonction modèle par rapport aux paramètres à estimer. Ces bornes sont généralement estimées pour le paramètre amplitude (Lundbom et al., 2009; Snyder et al., 2010).

Seules les amplitudes estimées avec des bornes de Cramér-Rao inférieures à 20% de l'amplitude ont été prises en considération pour l'analyse quantitative des quantités et compositions lipidiques *in vivo*.

### 1.10.5 Choix de la référence

A partir des spectres acquis *in vivo*, les concentrations absolues peuvent, en principe, être calculé et exprimé en mmol/L ou par  $\mu\text{mol/g}$  de tissu chez l'homme ou chez l'animal. Cependant, la mise en place de cette quantification absolue requiert une calibration ainsi que la correction de tous les facteurs possibles pouvant introduire un biais (les temps de relaxation, la position du voxel,...), ce qui peut s'avérer difficile à mettre en œuvre lors de chaque expérimentation.

Certaines études affirment qu'un composé endogène (interne), stable et de concentration connue peut servir de référence pour les quantifications *in vivo*. Parmi ces références internes utilisées en spectroscopie, nous pouvons citer l'eau (Barker et al., 1993) et la créatine totale (créatine et phosphocréatine) (Yerli et al., 2007).

D'autres études font appel à une référence externe : un fantôme de composition connu positionné près du patient (Bakken et al., 2001) ou dont le spectre est acquis avant chaque acquisition (Chen et al., 2006).

Recourir à une référence interne est plus facile qu'à une référence externe, puisque les conditions d'acquisitions sont les mêmes (les mêmes corrections automatiques sont appliqués). Cependant, la référence interne est sensible aux changements en T2 et sujette à modification lors des pathologies. Lors d'une étude multi centre pour l'étude du cerveau grâce à la SRM, l'eau choisie comme référence interne donnait la précision et la reproductibilité les plus acceptables comparés aux autres références. C'est également la méthode la plus accessible et la plus facilement mise en place (Keevil et al., 1998).

Dans notre étude *in vivo*, l'eau est choisie comme référence interne.

### 1.10.6 Prise en compte des temps de relaxation T1/T2

La valeur de ces temps de relaxation doit être prise en compte au moment de l'estimation des contributions lipidiques dans le voxel d'intérêt, car le signal acquis est pondéré par ces deux temps de relaxation. Leurs valeurs peuvent évoluer dans des situations pathologiques, notamment ils augmentent au cours de l'évolution d'une fibrose (Chow et al., 2012).

Plusieurs techniques existent pour mesurer les temps de relaxation (Mitchell et al., 2009).

#### (a) Temps de relaxation longitudinal T1

Le retour à l'équilibre de la composante longitudinale  $M_z$  correspond à la relaxation longitudinale T1 appelée relaxation *spin-réseau*. Kingsley, 1999 a recueilli les principales techniques pour la mesure de celui-ci. Nous pouvons citer la séquence d'inversion-récupération ainsi que la séquence de saturation-récupération. La première consiste en une impulsion de  $180^\circ$  suivie d'une impulsion de  $90^\circ$  (ou schéma de localisation PRESS/STEAM dans le cas *in vivo*) après un temps  $t$ . La deuxième en une succession d'impulsions de  $90^\circ$  (ou schéma), séparé d'un temps  $t$ . En appliquant plusieurs temps  $t$ , nous pouvons recueillir le temps de relaxation T1 selon l'équation 6

pour l'inversion récupération ou selon l'équation 7 pour la saturation-récupération. Les valeurs des temps de relaxation retrouvés dans la littérature sont reportées sur la Table 26.

$$M_Z(t) = M_0 - (M_0 - M_Z(0))e^{-t/T_1} \text{ (Équation 6) avec } M_Z(0) = -M_0$$

$$M_Z(t) = M_{Z0}(1 - e^{-t/T_1}) \text{ (Équation 7)}$$

(b) Temps de relaxation transversal T2

Le retour à l'équilibre de la composante transversale  $M_{xy}$  correspond à la relaxation transversale T2. C'est la relaxation *spin-spin* et fait intervenir le déphasage des spins. Ce retour à l'équilibre se fait suivant l'équation 8. La mesure du temps de relaxation spin-spin se fait principalement grâce aux échos de spin et principalement grâce à la séquence de Carl-Purcell-Meiboom-Gill (Carr and Purcell, 1954; Meiboom and Gill, 1958). Un écho de spin est une impulsion de  $90^\circ$  suivie d'une impulsion de  $180^\circ$ .

$$M_{xy}(t) = M_{0xy} \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \text{ (Équation 8)}$$

Nous reportons également les valeurs trouvées dans la littérature ( Table 27).

Auteur	Champ (T)	Population	Echantillon/ Organe	Déplacement chimique (ppm)						
				4,7	2,8	2,25	2	1,6	1,3	0,9
Asanuma et al., 1999 (a)	7,05	rat	Foie sain	1197±50	-	-	-	-	-	-
			Foie avec une hépatite aigue	901±45	-	-	-	-	-	-
Gambarota et al., 2004 (b)	7	rat	Foie sain	1000	-	-	-	-	-	-
			Foie métastasé	1770	-	-	-	-	-	-
Stanisz et al., 2005	3	souris	<i>In vitro</i>	812	-	-	-	-	-	-
Hu and Nayak, 2010	3	-	Graisse pur	-	-	-	-	-	314	-
			Tissu adipeux	-	-	-	-	-	312	-
			Mélange lard	-	-	-	-	-	282	-
Dimitrov et al., 2012	7	homme	Sein	-	<i>629±72</i>	<i>465±22</i>	<i>502±11</i>	<i>470±15</i>	<i>549±16</i>	<i>1071±27</i>

Table 26 : Temps de relaxation T1 (ms) des résonances lipidiques ainsi que de la résonance de l'eau dans la littérature (a) Temps de relaxation calculé selon la séquence de sélection VOSY avec inversion-récupération et (b) temps de relaxation calculé en inversion récupération avec la séquence FLASH, en italique les temps de relaxation calculés avec STEAM, les autres temps de relaxation sont calculé avec la séquence PRESS.

Auteur	Champ (T)	Population	Echantillon/ organe	Déplacement chimique (ppm)										
				5,3	4,7	4,29	4	2,8	2,25	2	1,6	1,3	0,9	
Deslauriers et al., 1988	8,4	souris	Foie, <i>in vitro</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54-67	-
Garbow et al., 2004	4,7	souris	foie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	27
Gambarota et al., 2004 (a)	7	rat	Foie sain Foie métastasé	-	22,3 63,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ren et al., 2008	7	homme	Tissu adipeux	-	-	-	-	59	60	42	33	69	74	
Strobel et al., 2008	7	souris	Tissu adipeux	36	-	20	19	47	33	25	19	51	41	
Hamilton et al., 2009	1,5	homme	foie	-	36,8 (35,2)	-	-	-	-	20,3 (39,2)	-	57,1 (75,5)	18 (45)	
Hamilton et al., 2010	3	<i>In vitro</i> homme	Microlipid ® foie	38,7 -	- -	25 -	-	41,5 51	-	41,9 52	-	46 62	71,4 83	
Ye et al., 2011	9,4	Souris <i>Ob/ob</i>	foie	40	-	15	15	20	28	30	11	40	40	
		Contrôle	foie	-	-	-	-	-	-	-	20	50	25	
van Werven et al., 2011	3	rat	foie	39,8	33,2	-	-	57	-	-	-	61,6	-	
Dimitrov et al., 2012	7	homme	sein	42±19	-	-	-	40±3	36±3	32±4	40±8	52±17	41±18	

Table 27 : Temps de relaxation T2 (ms) des résonances lipidiques *in vitro* et *in vivo* ainsi que de la résonance de l'eau chez la souris et chez l'homme. En italique, les temps de relaxation sont obtenus grâce à la séquence STEAM, les autres sont obtenus grâce à la séquence PRESS, sauf pour (a) : calcul par imagerie, séquence Inversion Récupération FLASH. Le microlipid ® est un complément alimentaire dont la composition lipidique est connue. Si mentionné, valeurs moyenne ± écart-type.

*In vitro*, pour la mesure du temps de relaxation T1, une série d'acquisitions a été réalisée à différents temps de répétition dans la gamme 1000-8000 ms avec un TE fixe de 16 ms. Pour la mesure du T2, une série d'acquisitions a été réalisée à un TR fixe de 5000 ms et des TE allant de 16 à 100 ms. Ces paramètres ont été utilisés pour les trois échantillons : l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate. Pour l'huile de tournesol, seules les acquisitions pour le calcul du temps de relaxation T2 ont pu être réalisées, avec des TE de 16, 21, 26, 31, 36 et 100ms pour un TR fixe de 5000 ms. A TR=5000 ms à haut champ, toutes les résonances étaient supposées avoir relaxé. La Table 28 récapitule les paramètres d'acquisitions pour les autres échantillons.

	Plage de variation de TE (ms)	Plage de variation de TR (ms)
Mesure du T2	16, 21, 26, 31, 36, 51, 61, 100 (N=8)	5000
Mesure du T1	16	1000-8000 avec un pas de 1000 (N=8)

Table 28 : Paramètres d'acquisition (TE,TR ) pour les mesures de T1 et de T2 *in vitro*.

Les temps de relaxation ont été estimés en modélisant la variation des intensités des résonances des séries de mesures selon une exponentielle décroissante pour le T2 (Équation 8) et croissante pour le T1  $M_Z(t) = M_{Z0}(1 - e^{-t/T1})$  (Équation 7). A partir des acquisitions réalisées, les valeurs de temps de relaxation T1 et T2 ont été estimés.

*In vivo*, plusieurs acquisitions sans suppression d'eau à différents temps d'écho (21, 26, 31, 36 et 100 ms) ont également été faites. Pour l'estimation des temps de relaxation T1, des acquisitions avec suppression d'eau ont été réalisées avec des temps de répétition multiples de la période respiratoire (N=1 à 4) sur un sous-ensemble d'animaux (n=2-3) pour le groupe L-G6pc +/- HFHS et pour le groupe contrôle HFHS.



## 2. Chromatographie gazeuse

Dans le cadre de l'étude *in vivo*, les mesures de SRM sont complétées et mises en relation avec les mesures de chromatographie gazeuse (CG). Un calcul, réalisé à partir des données de CG, permet d'avoir une équivalence avec les mesures de SRM. Les données issues des deux techniques sont comparées.

Les manipulations de chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées par Hervé Guillou, chargé de recherche INRA, du laboratoire Toxalim de Toulouse (UMR 1331), sur le plateau de lipidomique de metatoul (<http://www.metatoul.fr/>).

La caractérisation des acides gras est décrite en détails par Zadavec et al., 2010. Les échantillons de foie ont été homogénéisés dans un mélange de méthanol/5mM éthylène glycol tetra-acétique (2 :1, v/v), les lipides correspondant à un 1mg de foie ont été extraits selon la méthode de Blygh et Dyer, grâce au glyceryl triheptadecanoate (0,5 g) comme référence interne. Les lipides extraits ont ensuite été transméthylés (convertis en méthyle) avec 1ml de BF<sub>3</sub> (boron fluoride) dans du méthanol (1 :20, v/v) pendant 150 min à 100°C, évaporé jusqu'à sécheresse et les ester méthyliques ont été extraits avec un mélange d'hexane/eau (3:1). La phase organique a été évaporée et dissoute dans 50µL d'éthylacetate. Un volume de 1µL d'ester méthylique a été analysé par chromatographie gaz-liquide avec un chromatographe Hewlett-Packard 5890 (Restek, Belfast, Royaume-Uni) utilisant une colonne capillaire en silice fondue de 30 m de longueur, de 0,32 mm de diamètre interne et de 0,25 mm d'épaisseur de film.

La température du four a été programmée de 110 à 220 °C à 2°C/min, le gaz vecteur est l'hydrogène (0,5 bar). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont à 225 °C et 245 °C respectivement. L'identification des esters méthyliques a été réalisée selon les temps de rétention des esters méthyliques standards.

### *Comparaison entre la chromatographie gazeuse et la SRM*

Les données de chromatographie gazeuse sont exprimées en pourcentage massique (g/100g d'acide gras). Afin de pouvoir comparer les résultats entre les deux techniques, chaque acide gras est décomposé en nombre de protons contribuant aux différentes résonances. Ce nombre de protons sera ensuite multiplié par la proportion relative de cet acide gras rapporté à la masse molaire de celui-ci. La contribution totale de cette résonance sera la somme de chaque contribution issue de tous les acides gras qui présentent cette résonance. Par exemple, l'acide palmitique (C16 :0) est composé d'un groupement méthyle (trois protons), d'un groupement  $\alpha$ -méthylène (2 protons),  $\beta$ -méthylène (2 protons) et de 12 groupements méthylène (12\*2 protons). La contribution du groupement méthyle sera donnée par la quantité relative de l'acide palmitique rapporté à sa masse molaire, multiplié par 3. Et la contribution totale du groupement méthyle sera la somme de toutes les contributions issues de chaque acide gras qui présente ce groupement.

### 3. Dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques

Les données issues de la SRM seront également confrontées aux résultats des dosages de triglycérides plasmatiques et hépatiques. Les lipides ont été extraits selon la méthode de Folch Folch et al., 1957 et les dosages ont été réalisés avec des kits commerciaux de Biomérieux ®. Le dosage est exprimé en mg/g de protéines.

### 4. Tests statistiques *in vivo*

Le test de Wilcoxon (test non-paramétrique) a été choisi pour comparer les groupes de souris alimentés avec des régimes alimentaires selon la quantité et la composition des lipides hépatiques. Le seuil de significativité est  $p < 0,05$ . Le test de Spearman a été utilisé pour analyser les corrélations entre les différentes techniques de mesures des lipides. Ce test est l'équivalent du test de corrélation de Pearson pour de faibles effectifs ( $n < 10$ ).

Les tests ont été réalisés grâce à la Statistics Toolbox de Matlab.

La représentation des résultats est réalisée par des boîtes de Tuckey (Tukey, 1977) , à partir de la fonction « boxplot » de Matlab.

### 5. Conclusion

Les stratégies d'acquisition et de quantification des signaux de SRM pour les études *in vitro* et *in vivo* ont été définies. Les paramètres retenus sont :

- un temps d'écho court, afin de minimiser les pertes du signal dues aux temps de relaxation T2 ;
- L'ajustement des gradients de brouillage pour réduire les problèmes de phase d'ordre 1 *in vitro* à  $4,7T$ ;
- L'ajustement manuel des gradients de « shims » pour avoir une meilleure homogénéité du champ ;
- La synchronisation des acquisitions selon la respiration de l'animal pour les acquisitions *in vivo* ;
- Le choix du nombre de composantes de la fonction modèle pour la quantification des spectres avec l'algorithme MSV.

Ces stratégies sont appliquées dans un premier temps dans l'étude *in vitro* d'échantillons lipidiques. Dans un second temps, cette méthode est appliquée dans l'étude d'un modèle de glycogénose soumis à deux régimes alimentaires différents. Les résultats de ces applications sont présentés dans le prochain chapitre. Pour l'étude *in vivo*, les mesures sont complétées par une analyse en chromatographie gazeuse.

## Chapitre III. Résultats et discussion

Nous présentons dans cette partie les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ainsi que les discussions qui en découlent.

### A. Etudes *in vitro* à 4,7 T

La Table 29 présente quelques exemples de spectres mesurés et estimés pour le couple de paramètres TE/TR : 16/5000 ms pour l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate. Les spectres acquis présentent les résonances attendues pour chaque échantillon. Pour la répétabilité des mesures, les différents spectres, sont analysés trois fois. La variation de la largeur de raie est calculée comme le rapport entre l'écart-type et la moyenne des valeurs. Cette variation est mesurée sur la résonance à 1,3 ppm. Elle est de 3% pour l'acide oléique, avec une valeur moyenne de 17 Hz, de 27% pour l'acide linoléique avec une moyenne de 10 Hz et de 4% pour le trioléate pour une valeur moyenne de 13 Hz pour le couple TE/TR 16/1000 ms.

Pour la quantification, les coefficients de variation des estimations des intensités varient de 4% pour la résonance à 2,25 ppm à 28% pour la résonance à 0,9 ppm.

Les temps de relaxation ont été estimés en modélisant la variation des intensités des résonances des séries de mesures selon une exponentielle décroissante pour le T2 et croissante pour le T1 (voir Chapitre II-B-1.9.3). A partir des acquisitions réalisées, les valeurs de temps de relaxation T1 et T2 ont été estimées. Un exemple d'ajustement des temps de relaxation T1 et T2 pour la résonance 1,3 ppm est présenté en Figure 35.

Les temps de relaxation T1 (Table 30) pour nos échantillons varient de 400 ms (court) pour les résonances proches du groupement carboxylique du trioléate à 2600 ms (long) pour le groupement oléfinique de l'acide linoléique. Les temps de relaxation T1 pour l'acide oléique et le trioléate sont similaires pour toutes les résonances. En ce qui concerne l'acide linoléique, le T1 de la résonance 5,3 ppm est de l'ordre de 2800 ms ce qui est deux fois plus important que les autres résonances et pour les autres échantillons. De même, la résonance à 2 ppm de l'acide linoléique présente un temps de relaxation T1 deux fois supérieur aux autres échantillons.

Un T1 long traduit un retour lent à l'équilibre. La relaxation dépend des noyaux excités et de leur environnement. L'acide linoléique comporte des protons diallyliques qui résonnent à 2,8 ppm, ce qui peut influencer les temps de relaxation des autres résonances voisines. De plus, les échantillons analysés ont été dissous dans du chloroforme, ce qui pourrait augmenter leurs temps de relaxation T1. En effet, le coefficient de viscosité influe sur le temps de relaxation. A titre d'exemple, chez des échantillons dont la proportion eau-gras varie de 0% à 100%, le temps de relaxation T1 du gras pur passe de 250 ms à 1600 ms pour un mélange eau pure + 2% agar (Hu and Nayak, 2010).

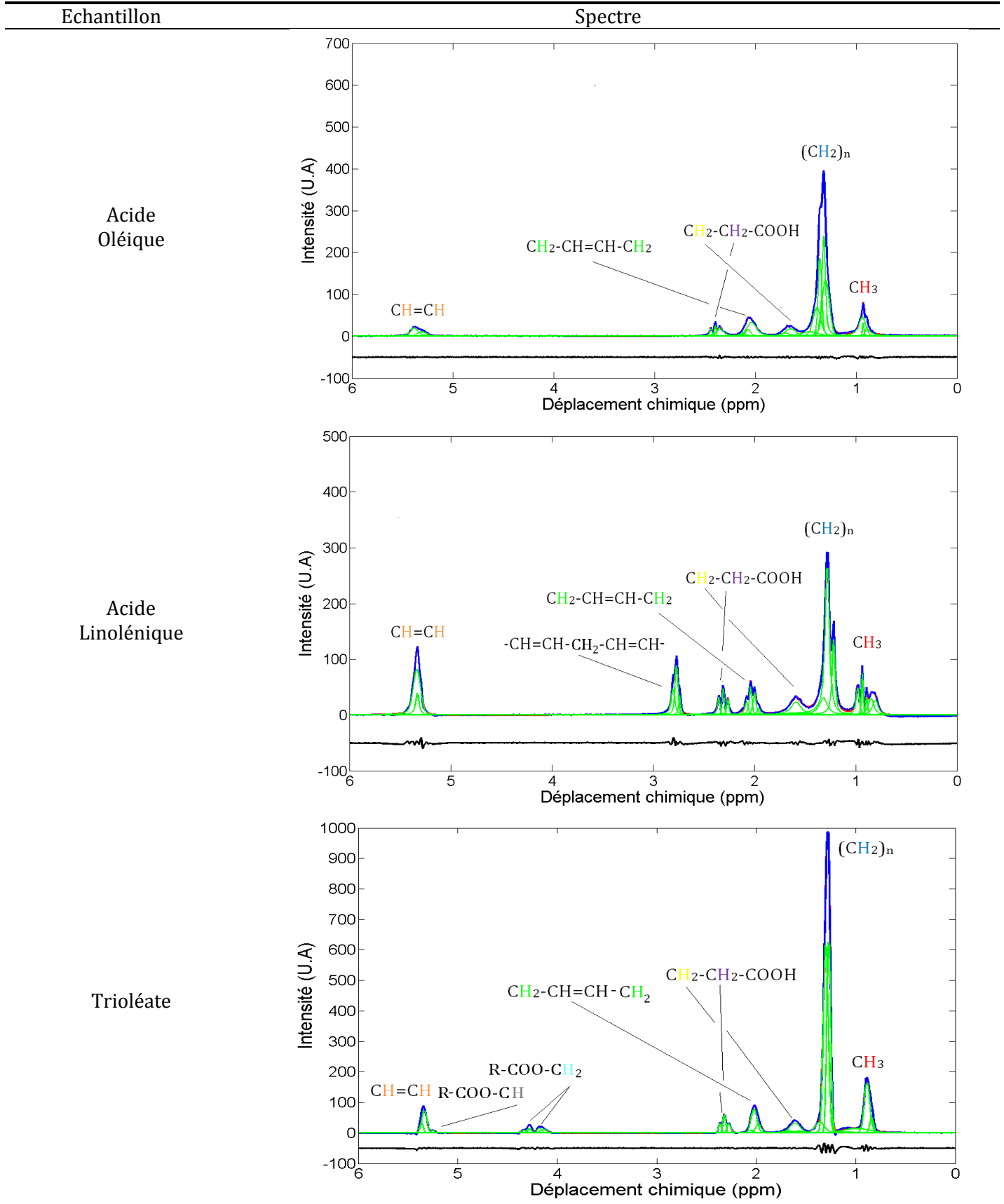
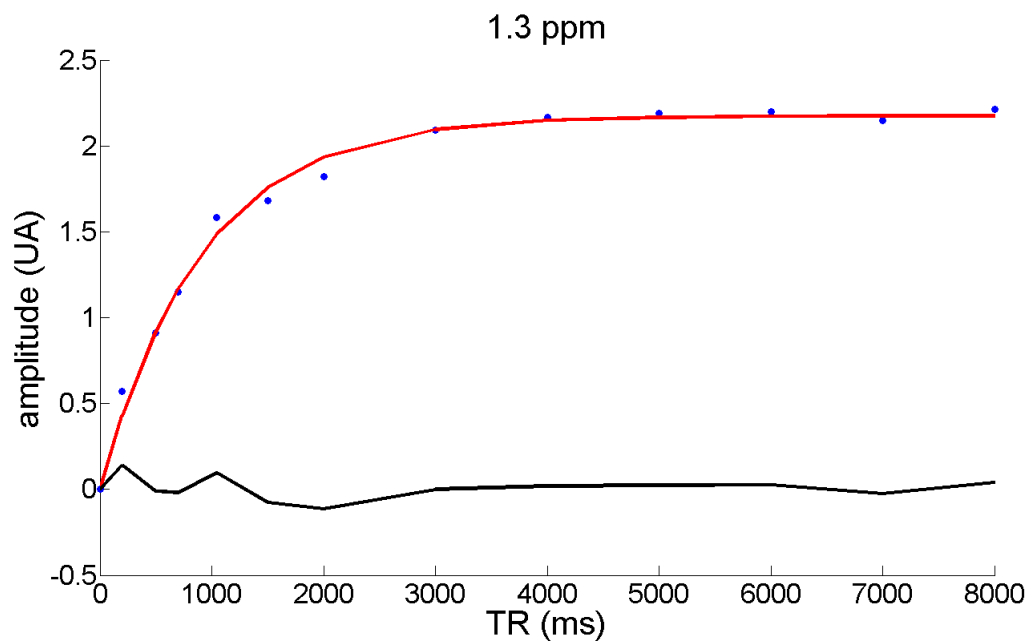
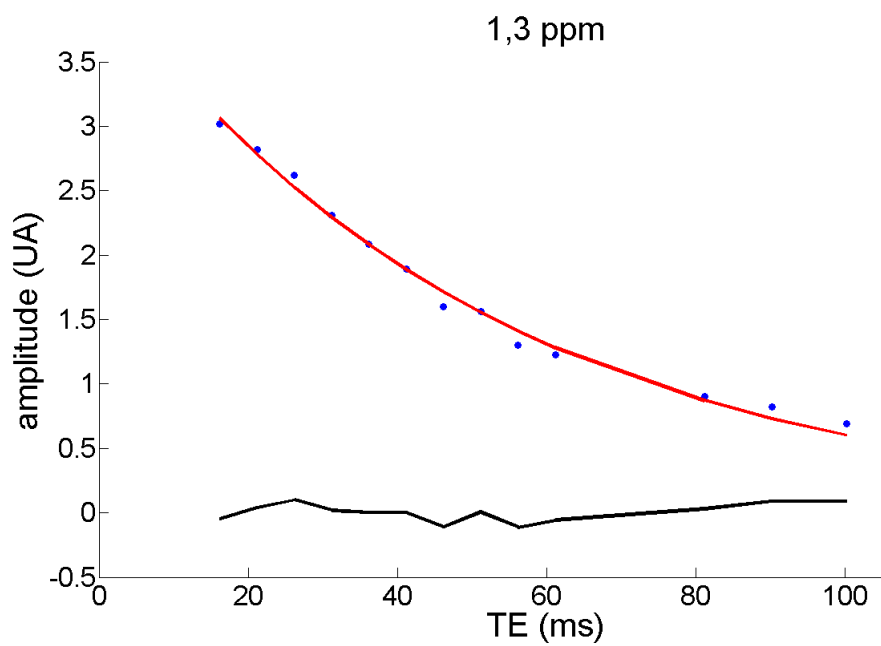


Table 29 : Spectres (TE/TR : 16/5000 ms) des acides oléique et linoléique, du trioléate avec attribution des différents groupements chimiques, (en bleu : spectre mesuré, en rouge : spectre estimé, en noir : résidu et en vert : spectre des composantes élémentaires).



(a)



(b)

Figure 35: Estimation de la valeur des temps de relaxation T1 (a) en fonction du TR et T2 (b) en fonction du TR pour la résonance 1,3 ppm de l'acide linoléique. Amplitude quantifiée (point bleu), ajustement mono exponentiel (courbe rouge).

Déplacement chimique (ppm)	Temps de relaxation T1 (ms)		
	Acide oléique	Acide linoléique	Trioléate
5,3	1345± 545	2863±447	1163±31
2,8	RI	1817±240	RI
2,25*	370±321	731±168	465±25
2	577±507	1440±116	661±40
1,6	504±532	743±234	408±82
1,3	852±255	832±76	829±72
0,9	1110±253	1794±1181	1258±414

Table 30 : Valeurs des temps de relaxation T1 estimées en ms (moyenne ± écart-type) pour les résonances des acides oléique et linoléique ainsi que du trioléate, RI : Résonance Inexistante, \*résonance à 2,32 ppm pour le trioléate

Les valeurs de T2 (Table 31) pour les trois échantillons varient de 22 ms à 65 ms. De même que pour les valeurs de T1, les valeurs de T2 de l'acide oléique et du trioléate sont similaires. Entre l'acide oléique, l'acide linoléique et le trioléate, les T2 du méthylène à 1,3 ppm ne diffèrent pas sensiblement. Par contre, le T2 de la résonance à 0,9 ppm de l'acide linoléique a une valeur de moitié celle des autres échantillons. L'acide linoléique peut présenter deux formes isomères : l'acide  $\alpha$ -linoléique, connu comme « oméga-3 » et l'acide  $\gamma$ -linoléique, nommé « oméga-6 ». Dans le cas de l'isomère  $\alpha$ -linoléique, le groupement méthyle qui serait proche de la double liaison résonnerait à 0,85 ppm au lieu de 0,9 ppm. Au cours de cette étude, le caractère oméga-3 de l'acide linoléique a été ignoré.

Déplacement chimique (ppm)	Temps de relaxation T2 (ms)		
	Acide oléique	Acide linoléique	Trioléate
5,3	55±14	33±4	51±2
2,8	RI	42±7	RI
2,25*	38±16	36±27	44±14
2	33±9	27±4	33±3
1,6	37±21	30±2	34±6
1,3	65±3	52±7	64±9
0,9	42±10	22±5	38±3

Table 31 : Valeurs des temps de relaxation T2 (moyenne ± écart-type) estimées pour les résonances des acides oléique et linoléique ainsi que du trioléate, RI: Résonance Inexistante, \* résonance à 2,32 ppm pour le trioléate.

Dans la littérature, pour les rares études *in vitro* rapportant des temps de relaxation, la valeur du temps de relaxation T2 à 1,3 ppm est généralement inférieure à la valeur du temps de relaxation T2 à 0,9 ppm, comme pour le cas du microlipid étudié à 3T (respectivement de 46 ms et de 71,4ms) (Hamilton, Yokoo et al. 2010 ; Lundbom, Heikkinen et al. 2009), contrairement à nos résultats. Une piste envisagée pour expliquer ces résultats contradictoires serait une sous estimation du temps de relaxation T2 de la résonance à 0,9 ppm, car l'estimation de celui-ci est perturbé par les modulations du signal dû au couplage J (Yahya and Fallone, 2010).

Les profils lipidiques sont donnés par l'intensité de chaque résonance estimée. Afin de pouvoir initier une comparaison entre les valeurs estimées et les valeurs théoriques, les rapports des intensités de résonances ont été choisis. Parmi les rapports retenus, certains reflètent la composition saturée ('1,3/0,9', '1,3/1,6', '1,3/2,25') ou insaturée ('2/2,25', '2,8'/2,25', '2/1,6', '5,3/0,9') de l'échantillon (voir Chapitre I-B-3). Les valeurs théoriques et les valeurs estimées expérimentalement ainsi que les erreurs d'estimation entre les rapports théoriques et les rapports expérimentaux corrigés avec les valeurs de temps de relaxation pour le couple TE/TR 16/5000 ms pour chacun des échantillons sont présentées en Table 32. Les coefficients de détermination, reflétant une bonne correspondance entre valeur théorique et valeur expérimentale pour les rapports choisis, pour les trois échantillons sont tous supérieurs à 0,7 (Table 33). Bien que certains rapports présentent des erreurs d'estimation supérieures à 20% et de fortes variabilités (écart type > 40%), en moyenne les mesures réalisées correspondent à la théorie. Il est difficile de cerner les sources de ces écarts à la théorie et de cette variabilité. Plusieurs aspects doivent être considérés : les largeurs de raies, les estimations T2 réalisées, les effets des couplage J très marqués *in vitro*. On peut néanmoins remarquer que l'écart aux valeurs théoriques se creuse et la variabilité des mesures croît dès que la résonance 0,9 est impliquée dans le rapport étudié.

Rapport	Acide oléique			Acide linoléique			Trioléate		
	Valeurs estimées	Valeurs théoriques	Erreurs d'estimation (%)	Valeurs estimées	Valeurs théoriques	Erreurs d'estimation (%)	Valeurs estimées	Valeurs théoriques	Erreurs d'estimation (%)
'1,3'/'0,9'	3,94 ±2,32	6,67	40	2,50±1,10	2,66	6	3,37±2,40	6,67	49
'1,3'/'1,6'	11,23±7,54	10	12	4,62±2,20	4	15	10,70±7,98	10	7
'5,3'/'1,6'	0,99±0,60	1	1	2,43±0,99	3	19	1,04±0,76	1	4
'1,3'/'5,3'	11,32±5,09	10	13	1,90±0,72	1,33	43	10,30±6,39	10	3
'2,8'/'2,25'	RI	RI	RI	2,19±0,40	2	9	RI	RI	RI
'2,8'/'2'	RI	RI	RI	1,03±0,15	1	3	RI	RI	RI
'2'/'2,25'	2,39±0,69	2	19	2,13±0,27	2	6	2,24±1,28	2	12
'2,25'/'1,6'	0,77±0,45	1	23	0,67±0,22	1	33	0,75±0,55	1	25
'2'/'1,6'	1,85±0,98	2	7	1,43±0,42	2	28	1,68±1,16	2	16
'1,3'/'2,25'	14,52±6,23	10	45	6,89±2,12	4	72	14,33±8,90	10	43
'5,3'/'2'	0,54±0,17	0,5	8	1,71±0,34	1,5	14	0,62±0,35	0,5	24
'5,3'/'0,9'	0,35±0,18	0,66	47	1,32±0,49	2	34	0,33±0,23	0,66	50

Table 32 : Valeurs estimées, valeurs théoriques et erreurs d'estimation des rapports des intensités des résonances des acides oléique et linoléique ainsi que du trioléate acquises avec PRESS TE/TR : 16/5000 ms. Les écart-types correspondent à la dispersion des différentes acquisitions.



Echantillon	Coefficient de détermination (R <sup>2</sup> )
Acide oléique	0,91 (n=10)
Acide linoléique	0,78 (n=12)
Trioléate	0,82 (n=11)

Table 33 : Coefficients de détermination entre les valeurs réelles et les valeurs théoriques pour les rapports de résonances retenus pour chaque échantillon.

Ces bons coefficients de détermination confortent la méthodologie proposée autant pour l'acquisition que pour le traitement pour des expériences *in vivo*.

## **B. Etudes à 7T**

### **1. Analyse de l'huile de tournesol**

Les valeurs des temps de relaxation T2 sont présentées à la Table 34.

Déplacement chimique (ppm)	Huile de tournesol
5,3	40,8±0,1
2,8	48,6±0,4
2,25*	28±1
2	34,0±0,1
1,6	17,6±0,3
1,3	49±2
0,9	38±1

Table 34 : Valeurs des temps de relaxation T2 estimées pour les résonances de l'huile de tournesol. Les écart-types pour l'huile de tournesol sont issus des erreurs d'estimation

Comme pour les autres acides gras, le temps de relaxation T2 de la résonance à 1,3 ppm est supérieur à celui de la résonance à 0,9 ppm. A nouveau, les effets du couplage J sur l'estimation du T2 de la résonance 0,9 ppm peuvent être invoqués pour expliquer ce résultat (Yahya and Fallone, 2010).

En comparant les temps de temps de relaxation T2 pour les principales résonances (1,3 ppm, 0,9 ppm) entre l'huile de tournesol acquis à 7T et les autres échantillons lipidiques acquis à 4,7T, une baisse des temps de relaxation est constatée à 7T. Cette baisse de temps de relaxation est également observée lors du passage à un champ magnétique élevé sur des métabolites *in vitro* (Cudalbu, 2006).

Le profil lipidique pour l'huile de tournesol est présenté à la Table 35.

Rapport	Huile de tournesol		
	Valeurs estimées	Valeurs théoriques	Erreurs d'estimation (%)
'1,3'/'0,9'	8,74±0,11	6,07	44
'1,3'/'1,6'	8,23±0,29	8,74	6
'5,3'/'1,6'	1,40±0,13	1,44	3
'1,3'/'5,3'	5,73±1,69	6,07	6
'2,8'/'2,25'	0,55±0,02	0,56	2
'2,8'/'2'	0,30±0,02	0,32	6
'2'/'2,25'	1,85±0,04	1,76	5
'2,25'/'1,6'	0,87±0,03	1	13
'2'/'1,6'	1,56±0,03	1,76	11
'2'/'0,9'	0,83±0,01	1,17	29
1,3'/'2,25'	9,41±0,31	8,74	8
'5,3'/'2'	0,90±0,08	0,82	10
5,3'/'0,9'	0,75±0,07	0,96	22

Table 35 : Valeurs estimées, valeurs théoriques et erreurs d'estimation des rapports des intensités des résonances de l'huile de tournesol acquises avec PRESS TE/TR : 16/5000 ms. Les écart-types pour l'huile de tournesol correspondent aux bornes de Cramér-Rao des valeurs estimées.

Pour les 13 rapports considérés, un coefficient  $R^2$  de 0,94 est trouvé entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales. En ne considérant que les indices, le coefficient de détermination entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales est de l'ordre de  $R^2 = 0,98$ .

	$\frac{3}{2} \frac{1,3}{0,9}$	$\frac{1}{2} \frac{2}{2,25^*}$	$\frac{1}{2} \frac{2}{1,6}$	$\frac{3}{4} \frac{2}{0,9}$	$\frac{3}{2} \frac{5,3}{0,9}$
Valeurs estimées	9,62±0,11	0,92±0,04	0,78±0,05	0,63±0,01	1,35±0,07
Valeurs théoriques	8,74	0,88	0,88	0,88	1,44

Table 36 : Valeurs théoriques et valeurs estimées moyennes des différents indices lipidiques pour l'huile de tournesol.

La méthodologie proposée en acquisition et en traitement a permis d'obtenir de bonnes corrélations entre les valeurs théoriques et estimées des rapports d'amplitudes des composantes des spectres mesurées *in vitro* des acides gras simples et des triglycérides. Les valeurs des temps de relaxation T1 et T2 des échantillons sont similaires pour l'acide oléique et le trioléate. Par contre, les temps de relaxation T1 sont beaucoup plus élevés pour l'acide linoléique que pour tous les autres échantillons au même champ magnétique. Cela pourrait s'expliquer par la présence de la liaison diallylique qui résonne à 2,8 ppm. La méthodologie validée pour les études *in vitro* a été déployée pour l'étude *in vivo* des lipides hépatiques.

## 2. Etudes *in vivo* à 7T

Cette étude a été réalisée en interaction avec F. Rajas, et ses collaborateurs de l'unité Inserm Nutrition et cerveau U855

### 2.1 Influence de deux régimes alimentaires chez un modèle murin de glycogénose

#### 2.1.1 Influence des régimes sur la masse des groupes

La courbe de suivi de poids est donnée à la

Figure 36. Le groupe contrôle STD présente une prise de poids progressive tandis que le groupe contrôle HFHS présente une prise de poids importante au cours des 9 mois, en passant de 20 g à 45 g.

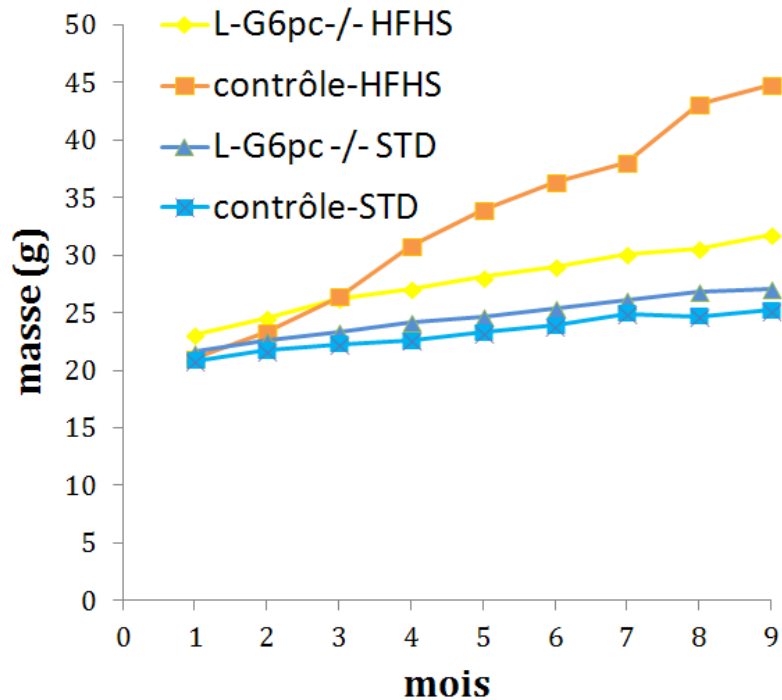


Figure 36 : Courbe de suivi des masses (moyenne) des différents groupes

## 2.1.2 Analyse par spectroscopie de résonance magnétique

### (a) Spectres

La Figure 38 montre des spectres typiques mesurés chez les souris de chaque groupe et représentés dans les mêmes échelles afin de pouvoir apprécier leurs différences. Les spectres montrent pratiquement les mêmes intensités, pour la résonance à 1,3 ppm, pour les groupes *L-G6pc* -/- HFHS, *L-G6pc* -/- STD, contrôle HFHS. Cette résonance est beaucoup plus élevée que pour le groupe contrôle STD.

La position du voxel dans le lobe droit du foie chez une souris du groupe *L-G6pc* -/- STD est illustrée à la Figure 37.

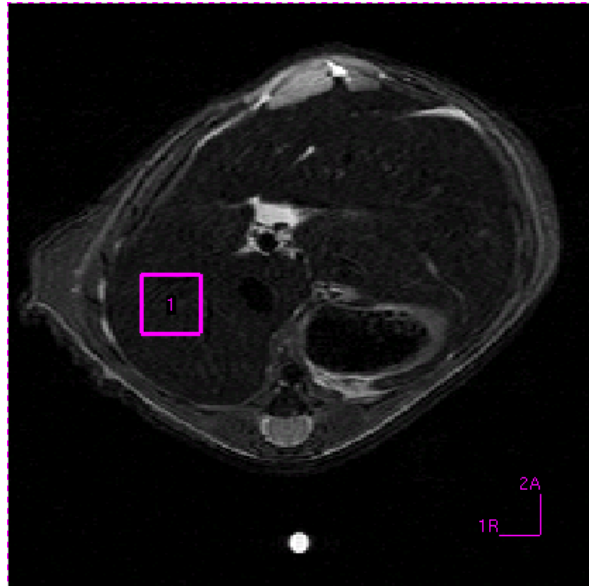
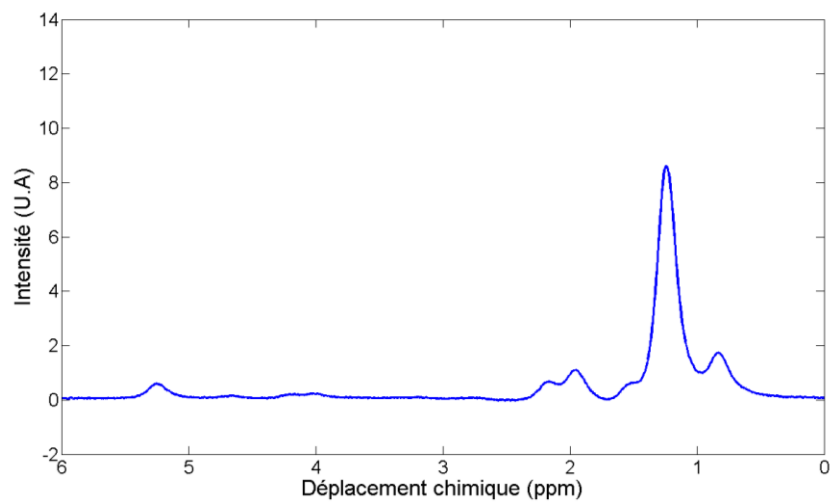


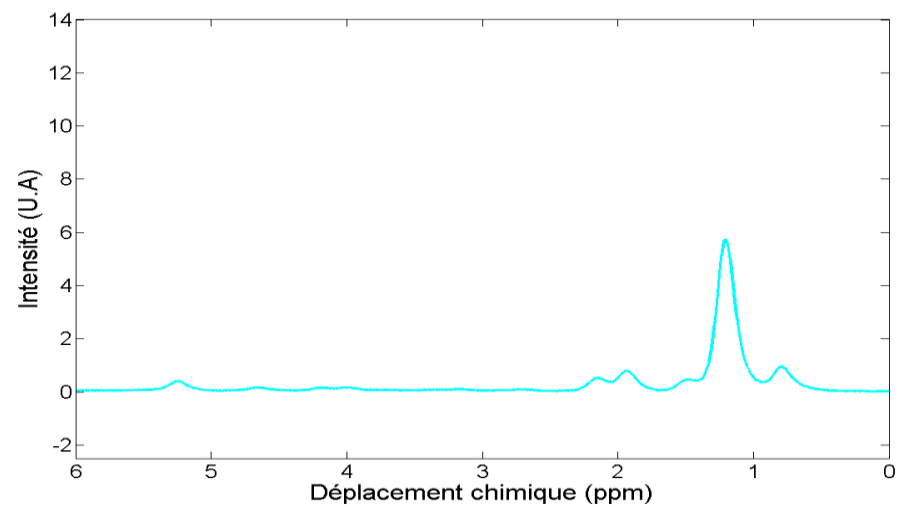
Figure 37 : Position du voxel d'intérêt sur une souris *L-G6pc*  $-/-$  soumise à un régime alimentaire standard, à partir d'une coupe axiale RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) pondérée T2.

Un exemple de résultat d'une quantification avec l'algorithme MSV est montré à la Figure 39.

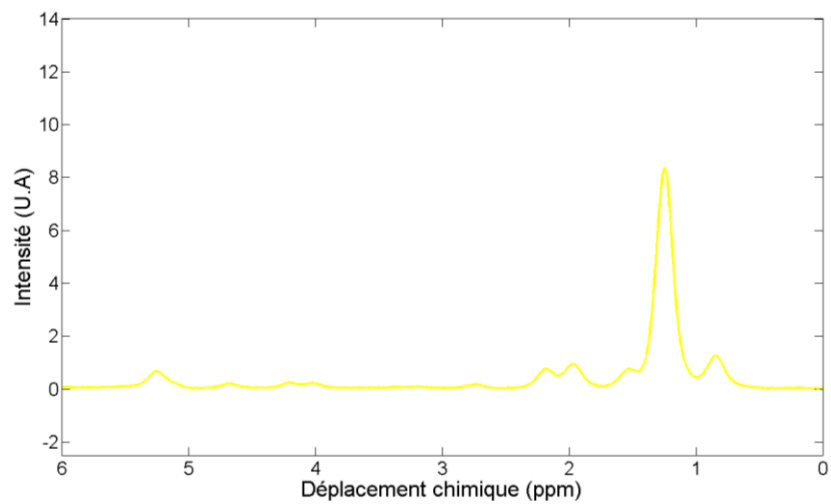
En définissant une quantification réussie par une mesure d'intensité du signal pour laquelle l'erreur d'estimation ne dépasse pas un certain seuil ( $CRB < 20\%$ ), les pourcentages moyens du taux de succès à  $TE = 16$  ms ont été calculés pour toutes les résonances. Ces taux sont reportés à la Table 37, sur les spectres avec suppression d'eau, mais également pour la résonance de l'eau à 4,7 ppm.



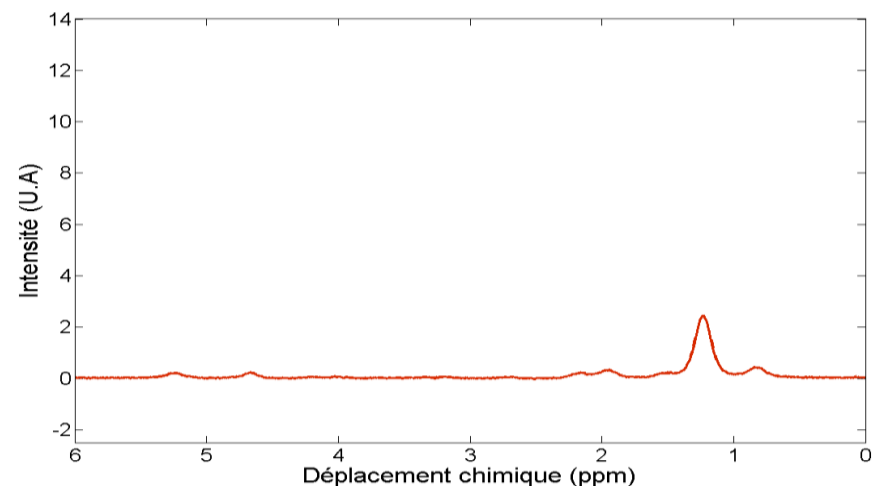
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 38 : Spectres avec suppression d'eau représentatifs des différents groupes d'animaux acquis avec une séquence PRESS TE/TR : 16/3000 ms : (a) *L-G6pc* <sup>-/-</sup> HFHS, (b) *L-G6pc* <sup>-/-</sup> STD, (c) contrôle HFHS, (d) contrôle STD. Les spectres ont été normalisés par rapport à l'intensité de l'eau.

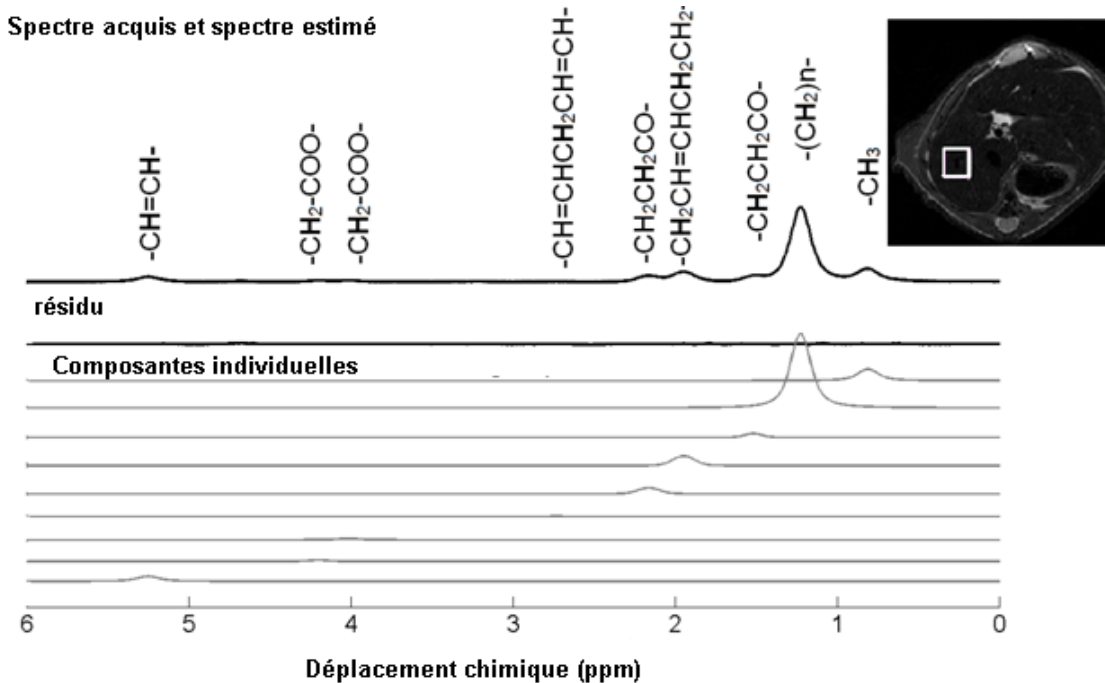


Figure 39 : Spectre avec une suppression d'eau acquis dans le lobe droit du foie chez une souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS (séquence PRESS TE/TR : 16/3000 ms, voxel : 27 mm<sup>3</sup>, NA=128). Neuf résonances sont quantifiées. De haut en bas : spectre acquis et spectre estimé, résidu et les spectres individuelles correspondant à chaque groupement chimique : groupement méthyle (0,9 ppm), groupement méthylène (1,3 ppm),  $\beta$ -méthylène au groupement carboxylique (1,6 ppm), groupement allylique (2 ppm),  $\alpha$ -méthylène (2,25 ppm) au groupement carboxylique, groupement diallylique (2,8 ppm), charpente du glycérol (4,29 ppm, 4 ppm), groupement oléfinique (5,3 ppm), en médaillon : position du voxel.

Groupe/résonance (ppm)	5,3	4,7	4,29	4	2,8	2,25	2	1,6	1,3	0,9
<i>L-G6pc</i> <i>-/-</i> HFHS (n=12)	100	100	83	67	0	100	100	100	100	100
<i>L-G6pc</i> <i>-/-</i> STD (n=15)	100	100	67	73	0	100	100	100	100	100
Contrôle HFHS (n=12)	100	100	83	67	50	100	100	100	100	100
Contrôle STD (n=5)	100	100	60	20	0	100	100	100	100	100

Table 37 : Taux de succès moyens avec un seuil à 20 % pour les bornes de Cramér-Rao pour la résonance de l'eau et les résonances lipidiques. Les taux de succès diffèrent pour chaque groupe pour les résonances '4,23' ppm et '4,07' ppm. Le taux de succès est nul pour la résonance '2,8' ppm sauf pour le groupe Contrôle HFHS dont le taux de succès est de 50 %. Les souris du groupe Contrôle HFHS, qui ont la masse la plus importante, ont également le foie le plus gras.

Dans la suite, les résonances '4,29 ppm', '4 ppm' et '2,8' ppm sont exclues de l'étude, car leur taux de succès entre chaque groupe varie entre 20 % et 83 % pour les résonances '4,29' ppm et '4' ppm et entre 0 et 50 % pour la résonance '2,8' ppm. Ces différences compromettent la fiabilité des comparaisons entre les différents groupes.

Le seuil de 20% a été appliqué aux quantifications issues des différents temps d'écho pour le calcul des temps de relaxation T2. Les valeurs moyennes des bornes de Cramér-Rao pour les différents temps d'écho sur les spectres sans suppression d'eau pour les groupes étudiés sont données en Figure 40, Figure 41 et Figure 42.

Pour les souris du groupe contrôle STD, les valeurs de Cramér-Rao associées aux résultats de quantification sont les plus élevées, ce qui s'explique en premier lieu par un plus faible rapport signal sur bruit des composantes lipidiques. Pour les composantes utilisées dans le calcul des indices (0,9 ppm, 1,3 ppm, 2 ppm, 2,25 ppm et 5,3 ppm), les bornes de Cramér-Rao sont en général inférieures à 20%.

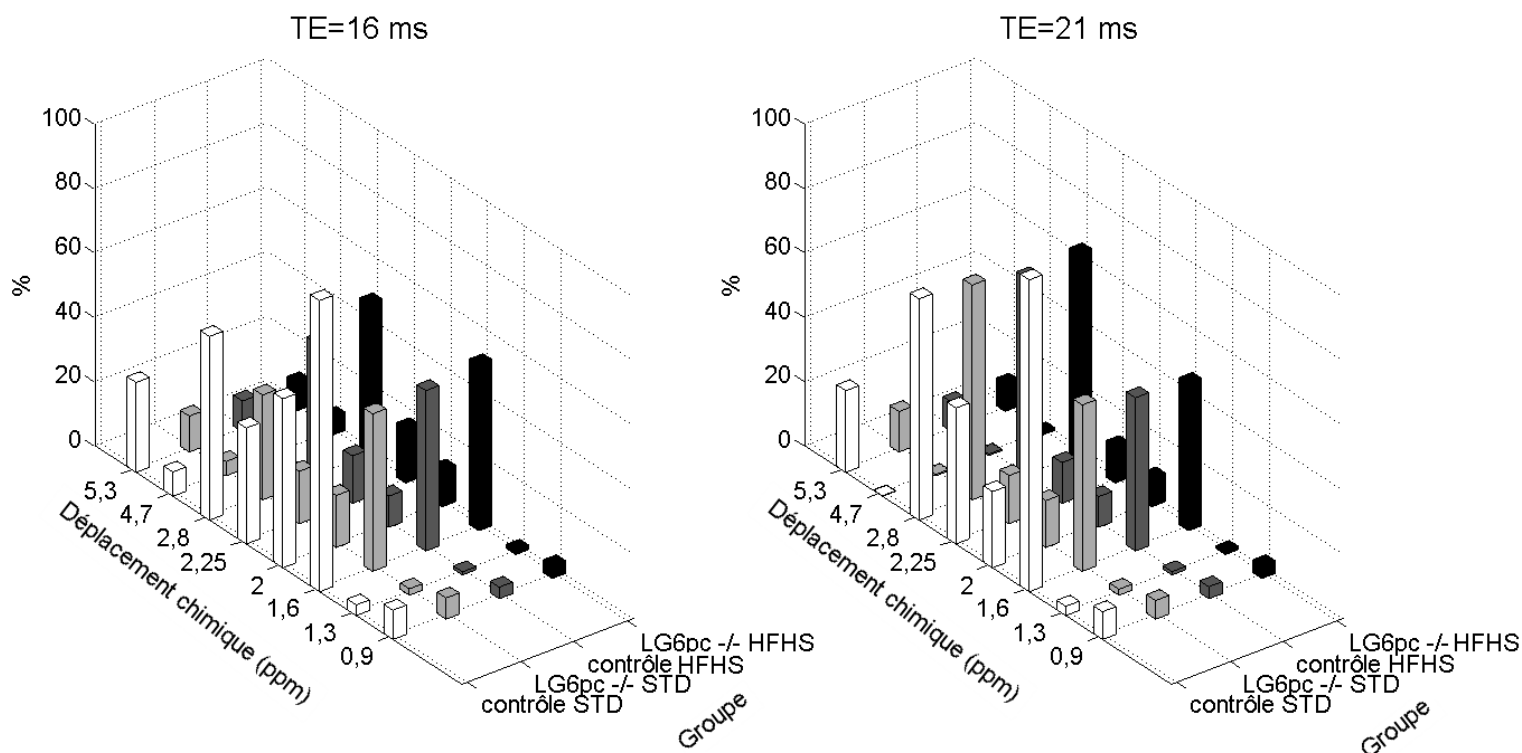


Figure 40 : Coefficients moyens de Cramér-Rao pour les amplitudes estimées des résonances aux temps d'écho TE=16 ms et TE=21 ms selon les différents groupes.



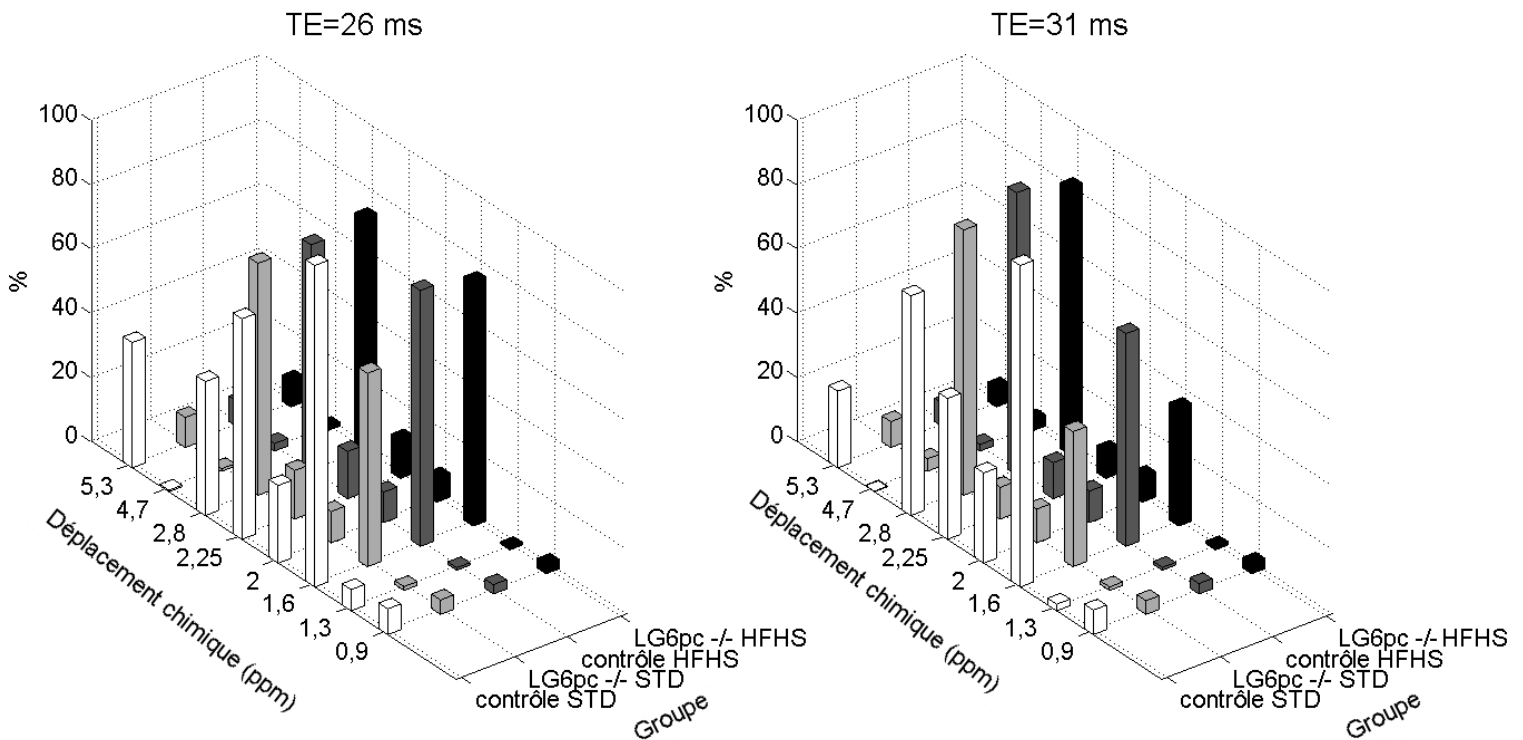


Figure 41 : Coefficients moyens de Cramér-Rao pour les amplitudes estimées des résonances aux temps d'écho TE=26 ms et TE=31 ms selon les différents groupes.

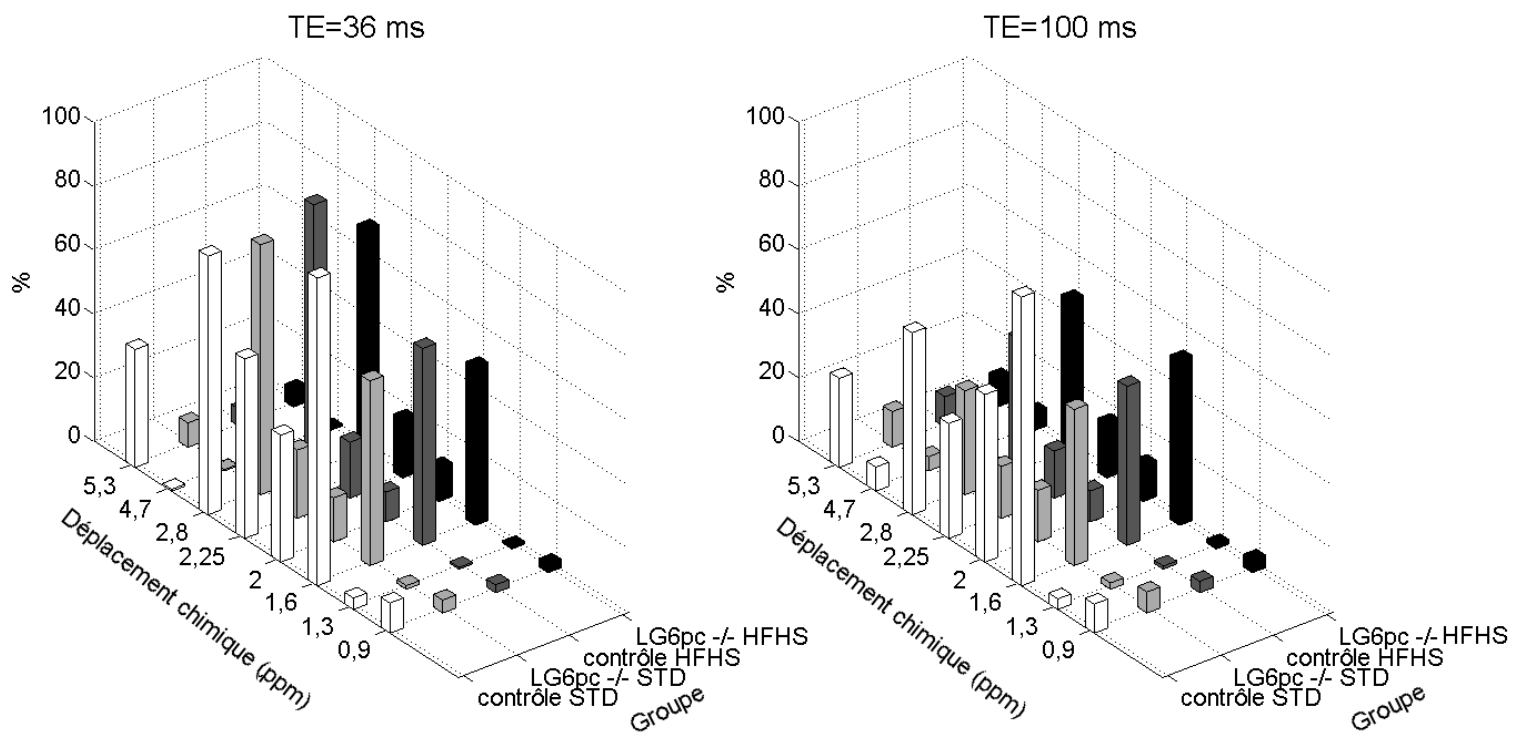


Figure 42 : Coefficients moyens de Cramér-Rao pour les amplitudes estimées des résonances aux temps d'écho TE=36 ms et TE=100 ms selon les différents groupes.

(b) Mesure des temps de relaxation T2

Les temps de relaxation T2 des composantes lipidiques ont été estimés pour tous les groupes d'animaux (Table 38). La Figure 43 illustre les estimations de certaines résonances pour une souris du groupe contrôle HFHS. L'estimation des temps de relaxation T2 est obtenue par un ajustement selon une loi mono-exponentielle décroissante des intensités des résonances selon les temps d'écho TE (voir Chapitre II.B.1.10.6).

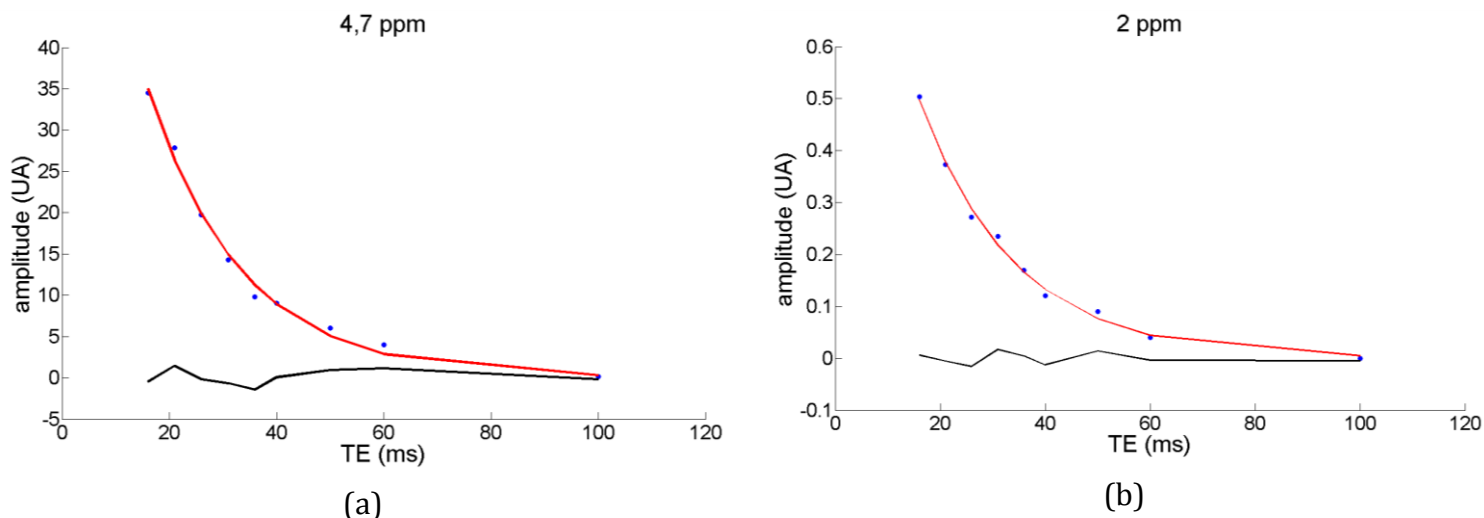


Figure 43 : Estimation des temps de relaxation T2 *in vivo* de l'eau (4,7 ppm R<sup>2</sup> = 0,99(a)) et du groupement allylique (2ppm R<sup>2</sup> = 0,99(b)) chez une souris du groupe contrôle HFHS. Amplitude estimée : points bleus, modélisation mono exponentielle : courbe rouge, résidu : courbe noire.

Groupe/résonance (ppm)	5,3	4,7	2,25	2	1,6	1,3	0,9
L-G6pc -/- HFHS	23±8 (n=12)	13±1 (n=12)	19±10 ¥*	22±6 (n=12)	26±16 (n=4)	39±5 (n=12)	29±9 (n=12)
L-G6pc -/- STD	20±18 (n=15)	14±2 (n=15)	19±7 (n=14)	20±7 (n=14)	23±10 (n=4)	35±8 ¥** (n=15)	26±8 (n=15)
Contrôle HFHS	32±17 (n=11)	13±2 (n=12)	31±11 (n=11)	25±6 (n=12)	95±61 (n=4)	39±6 §** (n=12)	24±8 (n=12)
Contrôle STD	12 (n=1)	14±2 (n=5)	6 (n=1)	21±5 (n=2)	5 (n=1)	24±3 (n=5)	26±18 (n=5)

Table 38 : Valeurs des temps de relaxation T2 (ms) estimées (moyenne ± écart-type) pour les composantes lipidiques pour les 4 groupes de l'étude (test de Wilcoxon, ¥ : significativement différent par rapport à son contrôle, §\*\* significativement différent par rapport à son contrôle, significativité : \*p<0,05, \*\*p<0,01).

Pour le groupe contrôle STD, une seule souris a pu être sélectionnée pour le calcul du temps de relaxation, selon les filtres de Cramér-Rao, les valeurs estimées pour le T2 pour cette unique souris sont de 12 ms pour la résonance à 5,3 ppm, 6 ms pour la résonance 2,25 ppm et 5 ms pour la résonance à 1,6 ppm (Table 38). Sans filtrage aux Cramér-Rao, ces valeurs sont de l'ordre de 24 ms pour la résonance 5,3 ppm et de 26 ms pour la résonance 2,25 ppm.

Les comparaisons entre les différents groupes sont réalisées si le nombre de souris dans un groupe est  $\geq 5$ .

Pour la résonance 1,3 ppm, les temps de relaxation T2 pour les groupes d'animaux issus du groupe L-G6pc -/- alimentés avec le régime standard sont statistiquement plus élevés par rapport à leurs contrôles alimentés avec le régime standard. Chez un modèle de fibrose de rat (Chow et al., 2012) à 7T, les valeurs de temps de relaxation T2, calculées par imagerie, fait état de la même tendance d'élévation des temps de relaxation sur la totalité du foie au cours de l'installation de la fibrose, bien que les souris de notre étude ne développent aucune fibrose. Nous supposons que les valeurs retrouvées par imagerie sont calculées à partir des résonances qui donnent le maximum de signal (les résonances de l'eau à 4,7ppm et du méthylène à 1,3 ppm). Cette élévation des temps de relaxation entre l'état normal (sans stéatose) et l'état pathologique (avec stéatose) est également présente au sein du groupe L-G6pc -/- STD et du groupe contrôle STD mais également entre le groupe contrôle HFHS et le groupe contrôle STD.

A 9,4 T, chez des souris *ob/ob* et contrôle (Ye et al., 2012), les temps de relaxation sont respectivement de 50 ms et 40 ms pour la résonance 1,3 ppm. Ces deux groupes peuvent être assimilés dans notre cas comme les souris contrôles sous régimes alimentaires HFHS et STD.

Par contre, les temps de relaxation T2 du groupe L-G6pc -/- HFHS pour la résonance 2,25 ppm sont statistiquement moins élevés que ceux du groupe contrôle HFHS.

Aucune différence significative n'est constatée pour les temps de relaxation T2 de l'eau entre tous les groupes.

### (c) Temps de relaxation T1

Les acquisitions pour la mesure des temps de relaxation T1 n'ont pu être réalisées que sur quelques souris (n=2-3), issues des groupes de souris L-G6pc -/- HFHS et de souris contrôle HFHS (Table 39). Le nombre de souris qui composent les groupes ayant donné lieu au calcul des temps de relaxation T1 ne dépassant pas 3, il est difficile de considérer les valeurs moyennées sur deux ou trois souris. Les valeurs ne sont présentées qu'à titre indicatif.

Groupe/résonance (ppm)	5,3	2,25	2	1,6	1,3	0,9
L-G6pc -/- HFHS	610 (n=3)	580 (n=2)	283 (n=3)	828 (n=1)	531 (n=3)	762 (n=2)
Contrôle HFHS (n=1)	859	607	77	61	784	65

Table 39 : Valeurs des T1 pour les souris du groupe L-G6pc -/- HFHS (n=2-3) et du groupe contrôle HFHS.

Pour le groupe contrôle HFHS, seules les mesures recueillies chez une souris ont été retenues car quatre points de mesures étaient disponibles. Il apparaît que les valeurs du temps de relaxation T1 pour les résonances 2 ppm, 1,6 ppm, 0,9 ppm ne peuvent être vraisemblables. En effet, ces valeurs estimées avoisinent plutôt les valeurs de temps de relaxation T2.

La correction des intensités avec les temps de relaxation T1 ne sera pas appliquée en raison du nombre insuffisant des valeurs disponibles pour les temps de relaxation et notamment pour les groupes. Néanmoins, une information concernant ces temps de relaxation a pu être recueillie chez les groupes alimentés sous régime hyperlipidique.

#### (d) Profils lipidiques

Le profil lipidique moyen est calculé pour chaque résonance et pour chaque groupe, avec leurs effectifs respectifs (Figure 44). Les valeurs des intensités ont été corrigées avec les valeurs moyennes des temps de relaxation T2 obtenues pour chaque groupe, en multipliant les valeurs acquises à 16 ms par  $\exp [16/T2(ms)]$ .

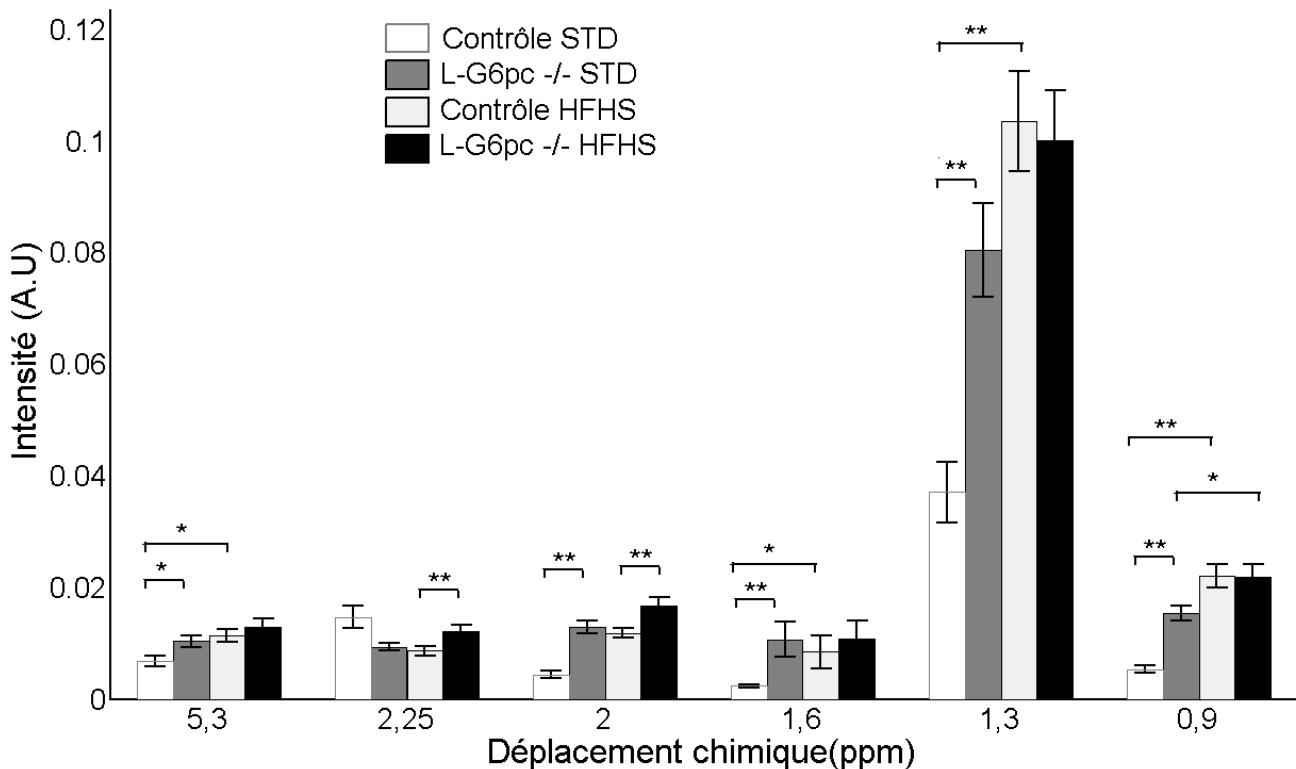


Figure 44 : Profil lipidique des différents groupes à 9 mois (moyenne et erreur moyenne) (\*p<0,05, \*\*p<0,01)

Les souris sous régime alimentaire HFHS (L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et contrôle HFHS) présentent de manière générale un profil lipidique beaucoup plus élevé que les souris sous régime alimentaire STD et de manière significative au sein du groupe contrôle. Pour le régime alimentaire HFHS, entre les souris L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et les souris contrôle HFHS : une différence significative n'est présente uniquement que pour la résonance à 2 ppm. Entre les souris L-G6pc<sup>-/-</sup> STD et les souris contrôle STD, les amplitudes des résonances 5,3 ppm, 2 ppm, 1,6 ppm, 1,3 ppm et 0,9 ppm sont significativement plus élevées chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD que chez le groupe contrôle STD. Entre le régime alimentaire HFHS et le régime alimentaire STD, aucune différence n'est constatée au sein des groupes L-G6pc<sup>-/-</sup>. Par contre, au sein des groupes contrôle, les amplitudes des résonances 5,3 ppm, 2 ppm, 1,6 ppm, 1,3 ppm, et 0,9 ppm sont significativement plus élevées sous régime hyperlipidique que sous régime standard.

Les mesures montrent que l'amplitude de la résonance à 1,3 ppm est significativement plus élevée : entre le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD et le groupe contrôle STD ainsi qu'entre le groupe contrôle HFHS et le groupe contrôle STD.

Cette élévation entre un régime alimentaire HFHS et un régime alimentaire STD a également été observée chez Garbow et al., 2004, qui a quantifié la quantité lipidique du foie sur des modèles apoB389.

#### (1) Indices lipidiques

Les indices lipidiques sont calculés à partir des résonances corrigées avec les valeurs de T2. Les résultats sont présentés en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

- **Quantité lipidique :**

La quantité lipidique est significativement plus importante au sein du régime HFHS que chez le régime STD chez le groupe contrôle. Aucune différence n'est constatée entre les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et les souris du groupe contrôle HFHS. Par contre, la quantité lipidique est significativement plus importante chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD par rapport au groupe contrôle STD. Aucune différence n'est constatée entre les deux régimes au sein des souris L-G6pc<sup>-/-</sup> (Figure 45-A).

- **Indice de saturation :**

Aucune différence significative entre les groupes sauf chez le groupe contrôle STD où il est significativement plus élevé par rapport au groupe contrôle HFHS (Figure 45-B).

- **Fraction d'insaturation**

Aucune différence n'est constatée entre le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et le groupe contrôle HFHS. Par contre, la fraction d'insaturation est significativement plus importante chez le groupe de souris L-G6pc<sup>-/-</sup> sous régime standard par rapport au groupe contrôle alimenté sous

régime standard. Aucune différence n'est constatée entre les deux régimes alimentaires au sein des groupes de souris L-G6pc<sup>-/-</sup>. Cependant, chez les groupes de souris contrôles, la fraction d'insaturation est significativement plus importante pour le groupe contrôle HFHS par rapport au groupe contrôle STD (Figure 45-C).

- **Indice d'insaturation totale des acides gras**

Il est significativement plus élevé pour le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS que pour le groupe contrôle HFHS. Aucune différence significative entre le groupe de L-G6pc<sup>-/-</sup> STD et le groupe contrôle STD. Aucune différence significative entre le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD, par contre, l'indice d'insaturation totale des acides gras est significativement inférieur chez le groupe contrôle HFHS que chez le groupe contrôle STD (Figure 45-D).

- **Insaturation totale**

Aucune différence n'est constatée entre le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et le groupe contrôle HFHS. Par contre, sans être significative ( $p=0,06$ ), l'insaturation totale est plus importante chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD par rapport au groupe contrôle STD. Aucune différence n'est constatée entre les deux régimes alimentaires au sein des groupes de souris L-G6pc<sup>-/-</sup>. Cependant, chez le groupe de souris contrôles, l'insaturation totale est plus importante au sein du régime hyperlipidique que chez le régime standard ( $p=0,06$ ) (Figure 45-E).

- **Indice d'insaturation totale des chaînes**

Il ne présente aucune différence significative entre les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS et les souris du groupe contrôle HFHS. Par contre, il est significativement moins élevé chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD par rapport au groupe contrôle STD. Aucune différence n'est constatée entre les deux régimes alimentaires au sein des groupes de souris L-G6pc<sup>-/-</sup> pour cet indice. Cependant, chez les groupes de souris contrôles, l'indice d'insaturation totale des chaînes est significativement inférieur au sein du régime hyperlipidique que chez le régime standard (Figure 45-F).

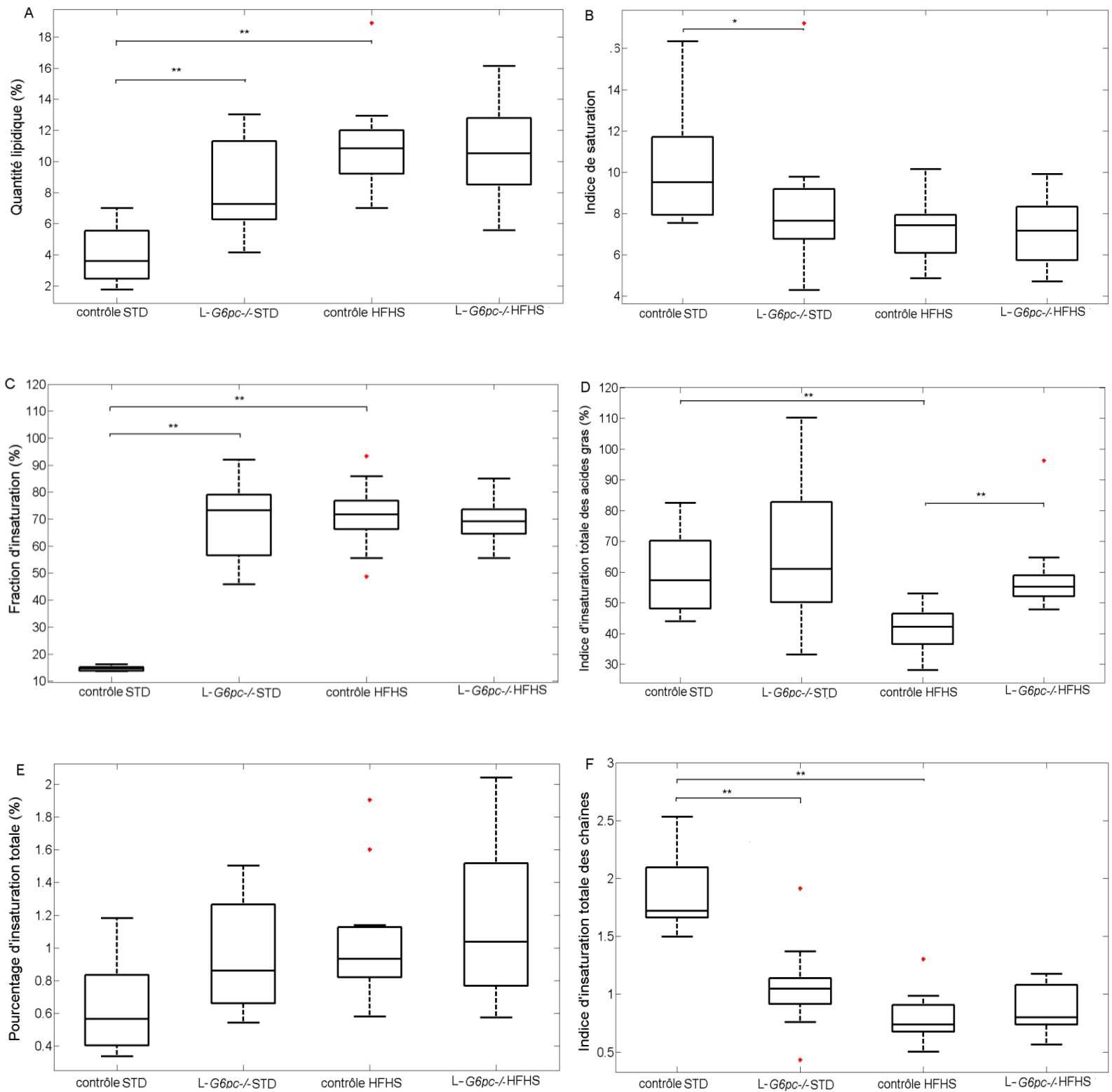


Figure 45 : Boîtes à moustaches des différents indices lipidiques : la quantité lipidique (A), l'indice de saturation (B), l'indice d'insaturation totale des acides gras (C), la fraction d'insaturation (D), l'insaturation totale (E) et l'insaturation totale des chaînes (F). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

### 2.1.3 Influence de la suppression d'eau sur la quantification des spectres

Afin de s'assurer de la fiabilité de nos quantifications, nous avons choisi d'avoir recours à la théorie des Cramér Rao, puis nous nous sommes fixés un seuil de 20%. Au-delà de ce seuil, les valeurs quantifiées étaient rejetées. Dans notre cas, en analysant les bornes de Cramér-Rao pour les différents groupes à TE=16 ms sans suppression d'eau (Figure 40), le groupe contrôle STD présente des bornes de Cramér-Rao au-delà du seuil fixé pour les résonances 5,3, 2,25, 2 et 1,6 ppm. La quantification de la résonance à 1,6 ppm pour tous les groupes sur les spectres sans suppression d'eau dépasse le seuil de 20%, alors que sur les spectres avec suppression d'eau, notre taux de succès est de 100% pour cette résonance (Table 37). La suppression d'eau, dans notre étude, est nécessaire car elle réduit les erreurs d'approximation (selon les bornes de Cramér-Rao) et permet une meilleure quantification, notamment pour les résonances qui peuvent être enchevêtrées sur les spectres sans suppression d'eau (5,3 ppm, 1,6 ppm).

### 2.1.4 Influence de la correction du temps de relaxation T2 sur la quantification des spectres

La Table 38 présente les différents temps de relaxation T2 que nous avons déterminé. Nous avons pu constater une différence significative notamment pour la résonance 1,3 ppm entre le groupe L-G6pc -/- STD et le groupe contrôle STD mais également entre le groupe contrôle HFHS et le groupe contrôle STD.



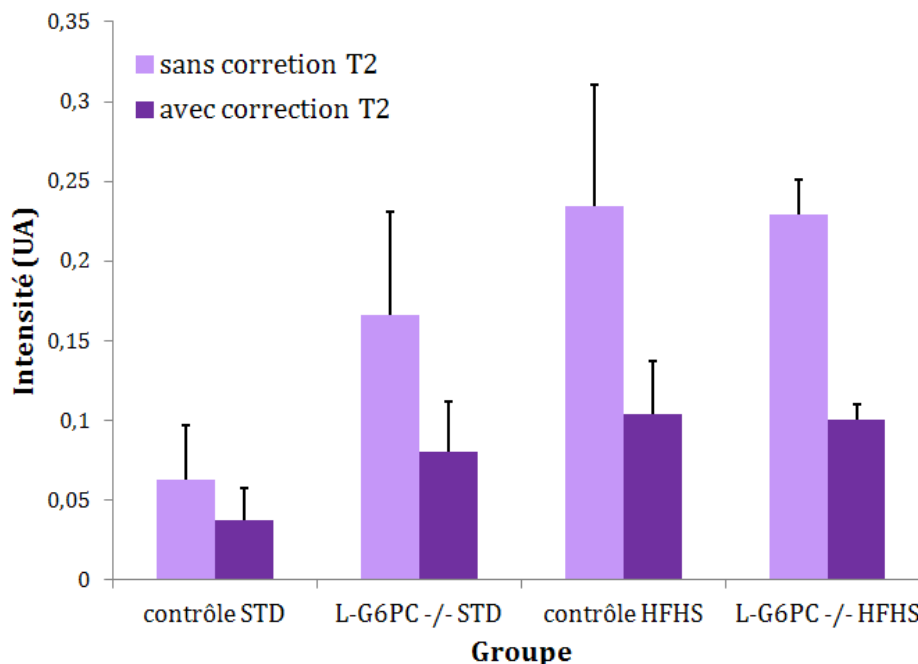


Figure 46 : Influence de la correction du temps de relaxation T2 sur la quantification de la résonance 1,3 ppm. L'intensité (moyenne  $\pm$  SEM) de la résonance est rapportée à celle de l'eau.

D'après le graphe (Figure 46), ne pas tenir compte des temps de relaxation T2 induit une surestimation des résonances. Cela se répercute sur la quantification de la stéatose hépatique, mesurée en SRM à partir de la contribution du pic de lipide majoritaire à 1,3 ppm rapportée à celle de l'eau et surévaluée sans correction des T2 ; une stéatose étant considérée comme significative à partir d'un seuil de 5% (Szczepaniak et al., 1999). Dans notre cas, en moyenne et sans correction T2, les souris contrôle sous régime STD auraient été désignées comme présentant une stéatose. Dans d'autres pathologies hépatiques (e.g hémochromatose, fibrose etc...), qui, pour certaines, peuvent se déclarer suite à d'une stéatose pure, les temps de relaxation T2 sont clairement affectés et leur prise en compte cruciale.

### 2.1.5 Analyse par chromatographie gazeuse

Les résultats sont présentés en Table 40. Les acides gras : C16:0 et C18 :1 n-9 présentent les acides gras les plus représentés. Les analyses en chromatographie gazeuse révèlent que :

- entre les souris du groupe L-G6pc -/- STD et les souris du groupe contrôle STD : le taux de SFA ainsi que le taux de PUFA sont significativement inférieurs chez les souris du groupe L-G6pc -/- STD, le taux de MUFA est significativement supérieur chez les souris du groupe L-G6pc -/- STD par rapport aux souris du groupe contrôle STD.

- entre les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS et le groupe de souris contrôle HFHS : le taux de SFA est significativement moins élevé chez les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS, le taux de MUFA est significativement plus élevé chez les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS et aucune différence significative n'est constatée entre les deux groupes pour le taux de PUFA.
- entre le régime alimentaire HFHS et le régime alimentaire STD au sein des souris appartenant au groupe de souris *L-G6pc* *-/-*, aucune différence significative n'apparaît pour le taux de SFA. Par contre, le taux de MUFA est significativement supérieur pour les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS et le taux de PUFA est significativement inférieur pour les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS.
- entre le régime alimentaire HFHS et le régime alimentaire STD au sein des souris appartenant au groupe de souris contrôles : le taux d'acides gras saturés est significativement supérieur chez les souris du groupe contrôle HFHS.

Acide gras	Contrôle STD (n=8)	L-G6pc-/- STD (n=7)	Contrôle HFHS (n=9)	L-G6pc-/- HFHS (n=11)
C14:0	0,33±0,04	0,45±0,08	1,22±0,11 ¥**	0,66±0,04 ¥**
C16:0	21,61±0,45	19,50±0,85 ¥*	27,12±0,2 ¥**	16,32±0,58 §* ¥**
C16:1n-9	0,52±0,03	1,23±0,15 ¥**	0,76±0,08 ¥*	1,58±0,09 ¥**
C16:1n-7	3,18±0,16	3,02±0,19	4,53±0,38 ¥*	1,55±0,07 §** ¥**
C18:0	9,84±0,37	8,76±0,73 ¥*	8,56±1,07	8,59±0,48
C18:1n-9	27,59±1,36	36,83±3,76 ¥**	30,93±2,73	48,51±1,54 §* ¥**
C18:1n-7	4,61±0,35	5,00±0,29	3,51±0,37	3,51±0,12 §**
C18:2n-6	13,39±0,53	9,70±1,59 ¥**	8,20±0,45 ¥**	4,99±0,26 §** ¥**
C18:3n-3	0,25±0,02	0,25±0,04	0,29±0,02	0,24±0,01 ¥*
C20:0	0,23±0,06	0,38±0,16	0,25±0,11	1,38±0,31 §*
C20:1n-9	0,50±0,07	0,80±0,14	0,44±0,07	1,00±0,26
C20:2n-6	0,57±0,09	0,74±0,08	0,39±0,04 ¥*	0,61±0,03 ¥**
C20:3n-6	1,07±0,08	1,03±0,13	0,75±0,08 ¥*	1,01±0,06 ¥**
C20:4n-6	9,22±0,69	7,13±1,02 ¥*	6,65±1,02	5,26±0,48
C20:5n-3	0,38±0,06	0,18±0,04 ¥**	0,33±0,05	0,11±0,02 ¥**
C22:6n-3	6,49±0,29	4,71±0,59 ¥*	6,01±0,83	4,06±0,39
SFA	32,05±2,85	29,16±2,56 ¥**	37,26±3,48 §**	27,00±2,12 ¥*
MUFA	37,79±2,99	50,78±3,97 ¥**	43,00±3,33	57,79±5,36 §* ¥**
PUFA	32,81±1,35	26,60±0,97 ¥**	24,25±0,91 ¥**	17,13±0,62 §*
n-3 polyinsaturé	7,12±0,75	5,14±1,73 ¥*	6,62±2,61	4,40±1,71 ¥*
n-6 polyinsaturé	24,25±2,75	18,60±7,05 ¥**	15,98±4,51 ¥**	11,87±2,44 §** ¥*
Ratio n-6/n-3	3,42±0,31	3,66±0,64	2,54±0,40 §**	2,77±0,32 §**

Table 40 : Taux moyen des acides gras hépatiques présents dans l'ensemble des prélèvements de foie analysés. Les valeurs sont exprimées en pourcentage (moyenne ± erreur moyenne). (¥ : Significativement différent par rapport à son contrôle, § : significativement différent par rapport au régime standard, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

### 2.1.6 Comparaison entre la chromatographie gazeuse et la spectroscopie de résonance magnétique

Seules les souris ayant subi les deux techniques ont été considérées. La répartition des groupes pour ces comparaisons sont : L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS (n=5), L-G6pc<sup>-/-</sup> STD (n=5), contrôle HFHS (n=5) et contrôle STD (n=3). Les comparaisons sont réalisées pour tous les indices. La population totale de souris est considérée.

Indice	Corrélation de Pearson (n=18)
IS	-0,42, p=0,07
FI	-0,01, p=0,94
IIAG	0,52, p=0,02*
IITC	0,45, p=0,06

Table 41 : Corrélation selon le coefficient de Pearson entre la SRM et la CG pour les différents indices sur le groupe total de souris ayant subi les deux techniques. \*p<0,05

Une corrélation significative de 0,52 est retrouvée entre les deux techniques pour l'indice IIAG.

#### (2) Dosage hépatique

##### (a) Dosage des triglycérides hépatiques

Les lipides ont été extraits selon la méthode de Folch Folch et al., 1957 et les dosages ont été réalisés avec des kits commerciaux de Biomérieux ®. Le dosage est exprimé en mg/g de protéines.

Le dosage des lipides hépatiques chez les différents groupes révèle :

- Pour les souris sous régime HFHS : de façon inattendue, une proportion significativement plus faible chez les souris L-G6pc<sup>-/-</sup> par rapport à leur contrôle.
- Pour les souris sous régime standard : une proportion significativement plus élevée chez le groupe de souris L-G6pc<sup>-/-</sup> par rapport à leur contrôle.

Groupe	Dosage lipides hépatiques (mg/g de protéines)
L-G6pc <sup>-/-</sup> HFHS (n=12)	58±6 ¥ *
L-G6pc <sup>-/-</sup> STD (n=7)	64±4 ¥ **
Contrôle HFHS (n=8)	107±18 §**
Contrôle STD (n=8)	22±2

Table 42 : Dosage des lipides hépatiques pour les différents groupes (moyenne ± erreur moyenne). (¥ : Significativement différent par rapport à son contrôle, § : significativement différent par rapport au régime standard, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

### (b) Comparaison des mesures SRM et de dosage

La corrélation entre les mesures issues de la SRM et des dosages a été réalisée sur les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD (n=5), entre l'intensité corrigée en temps de relaxation T2 de la résonance 1,3 ppm avec les valeurs de mesure de triglycérides. Une corrélation de 0,6 a été estimée (corrélation non significative).

En se penchant sur le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD, pour lequel l'analyse des triglycérides du foie a été faite par les trois techniques, les coefficients de variation des différentes techniques pour la résonance 1,3 ppm sont répertoriés dans la Table 43 . Dans le cas des dosages de triglycérides, les mesures obtenues sont considérées comme majoritairement constituées de lipides qui résonneraient à 1,3 ppm.

Groupe	Coefficient de variation (%)		
	SRM	CG	Dosage
L-G6pc <sup>-/-</sup> STD	33	3	18

Table 43 : Coefficients de variation pour les trois techniques (SRM, CG, Dosage) de mesure pour le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD.

La SRM présente le plus haut taux de dispersion dans ces résultats pour ce groupe. Cette dispersion peut s'expliquer par les conditions d'acquisitions différentes (emplacement du voxel, largeur de raie, temps de répétition) qui peuvent influencer la quantification. En ce qui concerne la dispersion entre les mesures de dosage et de CG, celle-ci peut s'expliquer par la localisation de la portion de foie analysée. La corrélation entre les techniques de dosage et de CG est de 0,8 (p=0,13) pour ce groupe.

## b) Discussion

Cette étude a permis d'analyser de manière non invasive, *in vivo*, grâce à la spectroscopie de résonance magnétique, le profil hépatique lipidique ainsi que la composition lipidique chez un modèle de glycogénose (L-G6pc<sup>-/-</sup>) soumis à deux régimes alimentaires différents. A 9 mois, les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> nourries sous régime alimentaire STD présentent une forte stéatose, aucun signe de fibrose ainsi que des adénomes (Mutel et al., 2011).

La stéatose était mesurée dans Mutel et al., 2011 par un dosage de triglycérides, elle est confirmée grâce à la quantité lipidique retrouvée par SRM pour le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD. Nos résultats montrent également qu'une stéatose est présente chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS, et le groupe contrôle HFHS. En plus d'avoir identifié une stéatose, la SRM a permis de mettre en évidence l'accumulation, beaucoup plus importante, de lipides chez les souris nourries sous régime alimentaire HFHS que sous régime alimentaire STD de manière significative chez le groupe de souris contrôles. Ceci a également été observé chez d'autres modèles (rat, souris ApoB38.9) soumis à deux régimes alimentaires différents (Delgado et al., 2009 ; Garbow et al., 2004).

Par contre, aucune différence significative pour la quantité lipidique n'a été constatée entre le régime alimentaire HFHS et le régime alimentaire STD au sein des souris L-G6pc<sup>-/-</sup>. Les données de chromatographie ont cependant montré, qu'entre les deux régimes chez les souris L-G6pc<sup>-/-</sup>, les MUFA sont beaucoup plus élevés chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> HFHS tandis que les PUFA sont plus élevés chez le groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD.

Une élévation de l'indice d'insaturation totale des acides gras, retrouvée dans notre étude, entre les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD par rapport aux souris du groupe contrôle STD est également retrouvée chez les L-G6pc<sup>-/-</sup> de souris atteints de stéatohépatite (Corbin et al., 2009), mais cette élévation n'est pas systématique. En effet, si pour les modèles stéatosiques, l'insaturation est élevée (van Werven et al., 2011), d'autres modèles de fibrose voient une baisse de la polyinsaturation à mesure que la fibrose progresse. (Cobbald et al., 2009).

Le profil lipidique montre une estimation des protons oléfiniques (5,3 ppm) significativement élevée chez les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD comparées aux souris du groupe contrôle STD. Nous avançons deux hypothèses pour expliquer cette proportion élevée. D'une part, le modèle L-G6pc<sup>-/-</sup> STD est un modèle qui accumule du glycogène, qui résonne entre autres à 5,4 ppm, dans la région des protons oléfiniques. D'autre part, comme les souris du groupe L-G6pc<sup>-/-</sup> STD développent des adénomes, cette élévation pourrait être associée à une hépatocarcinogenèse, comme celle reportée chez des modèles de souris atteints de cancer (Griffin et al., 2003). En effet, dans les situations de nécrose cellulaire, l'insaturation augmente. Cependant, les études histologiques pratiquées chez les souris L-G6pc<sup>-/-</sup> (Mutel et al., 2011) n'ont montré aucun signe de nécrose.

Le profil lipidique laisse apparaître une très faible proportion de la résonance 2,8 ppm, marqueur de la polyinsaturation, mais qui est également associée à une inflammation lobulaire (van Werven et al., 2012). Cette situation est en cohérence avec l'absence de marqueurs de fibrose chez les souris du groupe L-G6pc -/- STD.

Aucune différence significative n'apparaît entre le modèle et son contrôle, pour les deux régimes alimentaires en ce qui concerne les composantes saturées, cependant l'indice de saturation est significativement élevé chez les souris du groupe contrôle STD par rapport à tous les autres groupes, ce qui est contraire à une élévation de l'indice de saturation observée chez un modèle de fibrose (Cheung et al., 2011). La chromatographie gazeuse montre la même chose : les acides gras saturés sont moins élevés chez les souris L-G6pc -/- STD par rapport aux souris contrôle STD. Ce même profil est retrouvé chez un autre modèle de souris qui surexprime la ChREBP (Benhamed et al., 2012).

En conséquence, le comportement de la composition lipidique en cas de pathologies hépatiques varie fortement selon la nature fibrotique, inflammatoire, cancéreuse ou uniquement stéatosique du foie.

La puissance du champ magnétique permet d'avoir un meilleur rapport signal-sur-bruit ainsi qu'une meilleure résolution des différentes résonances par rapport aux bas-champ ( $\leq 3T$ ). Le champ élevé de 7T a permis une meilleure identification et quantification des résonances lipidiques grâce à la bonne résolution spectrale. Dans ce travail, le choix d'un meilleur rapport signal sur bruit a été privilégié. Un temps d'écho court permet de minimiser les pertes dues aux temps de relaxation T2 mais également d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit qu'un temps d'écho long. La séquence PRESS génère un meilleur rapport signal sur bruit que la séquence STEAM mais la séquence PRESS surestime la graisse et est plus dépendante des effets de couplage J (Hamilton et al., 2009). Ainsi la résonance à 0,9ppm, lors de l'estimation de son temps de relaxation T2, et particulièrement pour la séquence PRESS, ne présente pas une courbe d'évolution monoexponentielle en fonction de TE et ceci est dû aux couplage de ces proton méthyle avec le proton CH<sub>2</sub> voisins (Yahya and Fallone, 2010)..

Une absence de correction des intensités avec les temps de relaxation T2 induit à des erreurs d'estimation des lipides (Sharma et al., 2009). Les valeurs de temps de relaxation T2 n'ont révélé aucune différence significative pour les résonances de l'eau et du méthyle ni entre les souris L-G6pc -/- et les souris contrôle, pour les mêmes régimes ni entre les souris contrôles alimentées sous régime hyperlipidique et les souris contrôles alimentées sous régime standard, comme cela a pu être constaté entre les souris *ob/ob* et les souris contrôles à 9,4 T (Ye et al., 2012). Cependant, une élévation significative des valeurs de temps de relaxation T2 des souris du groupe L-G6pc -/- STD par rapport aux souris du groupe contrôle STD a été constatée pour la résonance du groupement méthylène à 1,3 ppm ainsi que pour les souris du groupe contrôle HFHS par rapport aux souris du groupe contrôle STD. Cette élévation du temps de relaxation T2 est à relier avec le fait qu'elle apparaît dans les groupes de souris présentant une stéatose.

Trois des groupes étudiés ont montré une stéatose selon la quantité lipidique. Au cours de ce travail, la résonance de l'eau a été choisie comme référence interne. Cependant, l'intensité de l'eau diminue avec le degré de stéatose (Marsman et al., 2010), ce qui dans notre cas, pourrait avoir influencé les mesures.

La synchronisation respiratoire donne lieu à une quantification beaucoup plus fiable et évite ainsi une sous estimation ou une surestimation (Garbow et al., 2004). Lors du calcul des temps de relaxation, certaines valeurs ont été exclues par le filtre des Cramér-Rao pour les différentes résonances des différents TEs acquis. Kreis, 2004 préconise un filtre à 50%, dans notre étude, ce critère est baissé jusqu'à 20%, ce qui est beaucoup plus restrictif. L'exclusion de ces valeurs n'a pas permis un ajustement acceptable pour le calcul de certains T2 puisque le nombre de points était insuffisant. Ces exclusions ont favorisé le choix des corrections avec les valeurs de groupe et non plus des valeurs individuelles.

L'algorithme de quantification utilise une fonction avec forme de raie Voigt comme fonction modèle. La forme de raie Voigt est plus appropriée pour la quantification des lipides que la forme de raie lorentzienne ou gaussienne (Ratiney et al., 2008). De plus, la fonction modèle associée à une forme de raie Voigt a déjà prouvé son efficacité dans la quantification des spectres *in vivo* du cerveau (Marshall et al., 1997) ou du sein (Gillies et al., 2006).

La suppression d'eau, réalisé avec le module VAPOR, a été considérée pour améliorer la qualité spectrale. Mais la résonance de l'eau à 4,7 ppm est proche de la résonance du groupement oléfinique à 5,3 ppm. Ce dernier aurait pu être affecté lors de cette suppression et cette résonance intervient dans la définition de plusieurs indices. Cependant, nous estimons que la dégradation du pic à 5,3ppm était minime : à 7T la différence de déplacement chimique est de 390Hz, la largeur à mi-hauteur de nos acquisitions étaient inférieures à 60 Hz et les impulsions de VAPOR centrée sur l'eau avaient des largeurs de bandes de 150 Hz.

Deux techniques de mesures complémentaires ont appuyé cette étude: la chromatographie gazeuse ainsi que le dosage biochimique. La combinaison de ces trois techniques d'analyse a été rarement présentée dans la littérature jusqu'à présent. Dans une étude de faisabilité pour déterminer la composition lipidique chez le rat à 3T, l'histologie et la chromatographie gazeuse ont été considérées et une corrélation de 0,59 ( $p < 0,005$ ) a été trouvée pour les acides gras polyinsaturés entre la spectroscopie de résonance magnétique et la chromatographie gazeuse (van Werven et al., 2012).

Le modèle de notre étude présente à la fois les manifestations hépatiques de la stéatose mais également les caractéristiques d'un foie dont les cellules sont nécrosées.

Une corrélation statistiquement significative de 0,52 ( $p < 0,02$ ) entre les valeurs obtenues par SRM et celles obtenues par CG est retrouvée dans notre étude pour l'indice d'insaturation totale des acides gras. Cette corrélation est de l'ordre de 0,9 ( $p < 0,05$ ) dans d'autres études à 3T, chez le rat stéatosique (van Werven et al., 2012). Pour la corrélation entre la SRM et le dosage de triglycérides, elle avoisine 0,62, sans être statistiquement



significative alors qu'en termes de coefficient de détermination, celui-ci a été reporté avoisinant les 0,9 entre les dosages lipidiques et la quantité lipidique (Garbow et al., 2004).

Ces différences peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. D'une part, le foie du modèle est adénomique et l'implantation des adénomes n'est pas homogène dans le tissu hépatique, même si toutes les précautions ont été prises pour éviter le positionnement du voxel d'intérêt au sein d'un adénome. Les corrélations trouvées dans la littérature sont issues de foies non adénomiques (Marsman et al., 2010; van Werven et al., 2011). En revanche, les mesures issues des techniques de chromatographie gazeuse et de dosage ont été réalisées sur une portion de foie. Aucune vérification préalable sur la présence d'adénomes n'a été réalisée, sauf si celle-ci était aberrante à l'œil nu.

Dans le tissu adipeux, la corrélation entre les mesures de chromatographie gazeuse et la spectroscopie RMN, est de l'ordre de 0,3, pour les temps d'écho court (30 ms), par rapport aux temps d'écho longs ( $r=0,8, TE=200$  ms) pour la résonance 5,3 ppm (Lundbom et al., 2009). Pour notre étude à temps d'écho court, la corrélation est en moyenne de 0,42, ce qui est proche des valeurs de la littérature.

En ce qui concerne les mesures de chromatographie gazeuse, elles ont été réalisées sur la totalité des lipides du foie, sans distinction entre les lipides d'origine intracellulaire et membranaire. Il convient de noter que les membranes cellulaires contiennent des phospholipides qui entrent dans les résultats de la chromatographie gazeuse, pouvant induire un biais dans les mesures. La correction des valeurs mesurées est réalisée, lorsque cela est possible, avec les temps de relaxation moyens de groupe.

Un régime intervient dans le métabolisme lipidique ainsi que sur la déposition des acides gras dans les tissus. La spectroscopie RMN permet d'apprécier les effets d'un régime et les études ont montré que la quantité lipidique est supérieure avec un régime hyperlipidique qu'avec un régime standard (Lim et al., 2009; Ciapaite et al., 2011). Dans notre étude, cette différence n'a pu être observée que chez les souris du groupe contrôle et aucune différence significative n'a été constatée entre les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* HFHS et les souris du groupe *L-G6pc* *-/-* STD.

En conclusion, cette étude a permis de caractériser les changements lipidiques, autant dans la quantité que la composition au sein du modèle de glycogénose soumis à deux régimes alimentaires différents à 9 mois à 7T. Aucune différence entre les régimes n'apparaît pour ce modèle, déjà stéatosique. Par contre, une élévation de la résonance 5,3 ppm, caractéristique de l'insaturation, chez les souris de groupe *L-G6pc* *-/-* STD, dont le foie est adénomique est observée par rapport aux souris du groupe contrôle STD.

## 2.2 Suivi longitudinal lors d'un changement de régime

Une étude a été réalisée afin d'évaluer les effets au cours du temps d'un changement de régime alimentaire sur les profils lipidiques du foie.

### 2.2.1 Protocole

Un groupe de six souris a été suivi pendant six mois, à partir de six mois de régime, avec des acquisitions en spectroscopie à 6, 8, 10 et 12 mois. Jusqu'à 9 mois, les souris sont soumises à un régime HFHS puis à un régime STD.

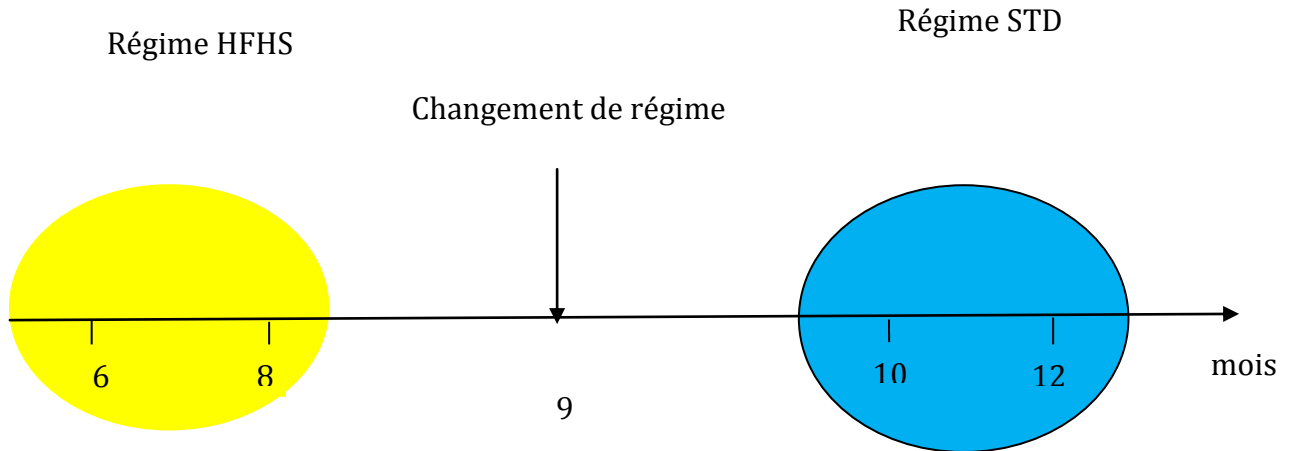


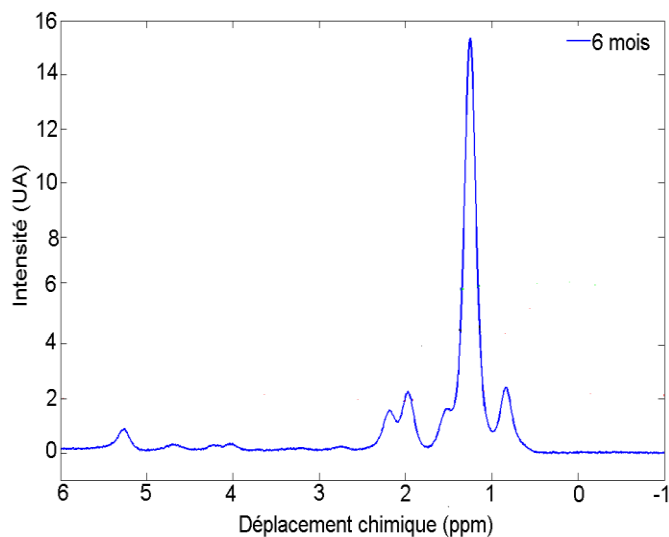
Figure 47 : Protocole de l'étude (acquisitions à 6, 8, 10, 12 mois et changement de régime à 9 mois) en jaune : régime HFHS, en bleu : régime STD.

### 2.2.2 Résultats

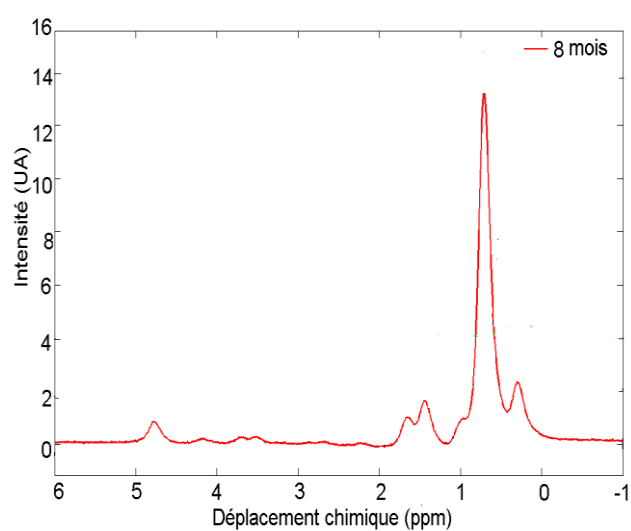
#### (a) Spectres

Les spectres sont normalisés par rapport à leur intensité en eau. Une décroissance forte des résonances lipidiques, principalement au niveau de la résonance 1,3 ppm est observée à 10 mois soit un mois après le changement de régime alimentaire. A 10 mois, toutes les souris du groupe ont développé des adénomes. Aucune correction des temps de relaxation n'a été appliquée pour cette étude.

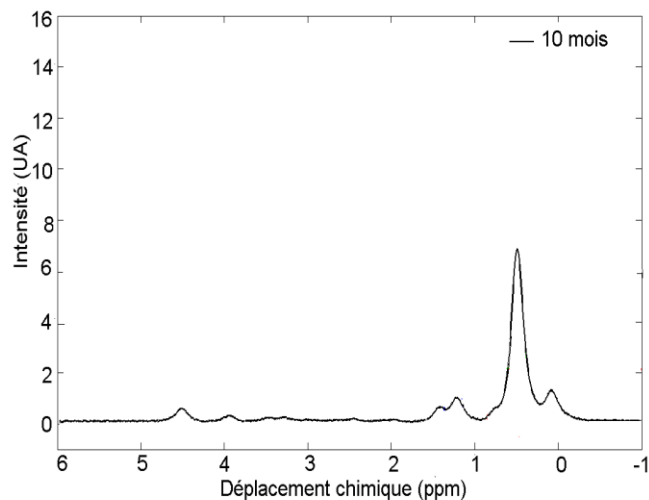
REGIME HFHS



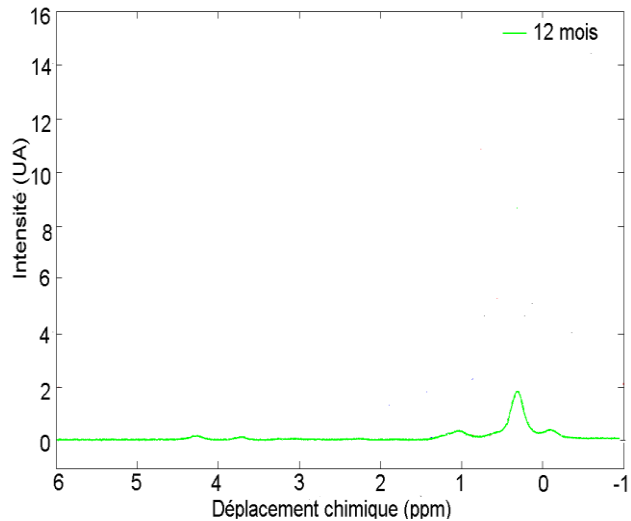
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 48 : Spectres typiques issus du lobe droit du foie chez une souris *L-G6pc*  $-/-$  mesurés à 6 (a), 8 (b), 10 (c) et 12 (d) mois. Un changement de régime HFHS en régime STD à 9 mois induit une baisse des profils lipidiques. (séquence PRESS TE/TR : 16/3000 ms, voxel : 27 mm<sup>3</sup>, NA=128).

### (b) Profil et indices lipidiques

Le profil lipidique indique que le régime HFHS favorise une augmentation de celui-ci et que ce profil baisse lors du changement de régime.

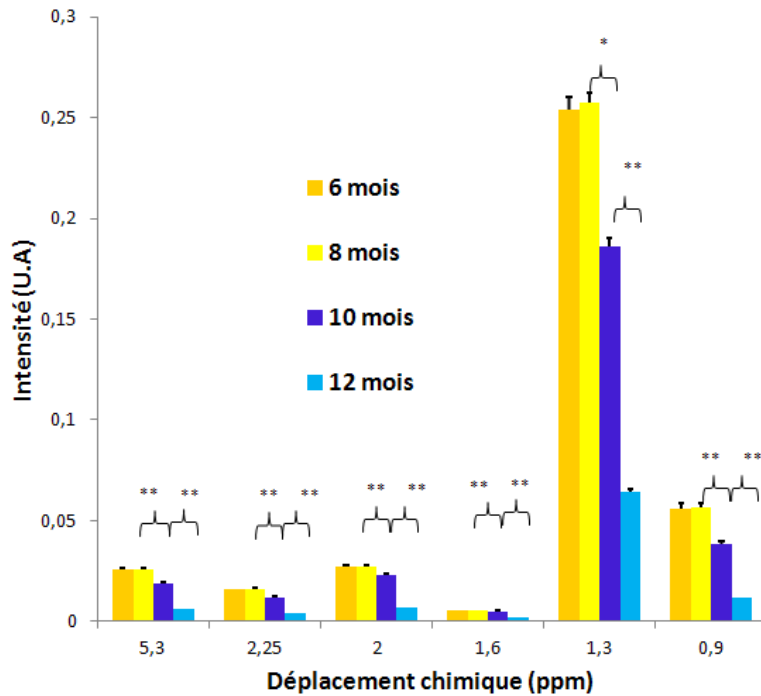


Figure 49 : Profil lipidique (moyenne + erreur moyenne) lors du suivi longitudinal au cours d'un changement de régime (\* p<0,05, \*\* p<0,01) en orange et jaune : sous régime HFHS, en bleu foncé et en bleu ciel : sous régime STD.

La décroissance est présente, au niveau des différentes résonances, notamment la résonance 1,3 ppm, qui est statistiquement différente après le changement de régime. Cette décroissance se poursuit jusqu'à 12 mois.

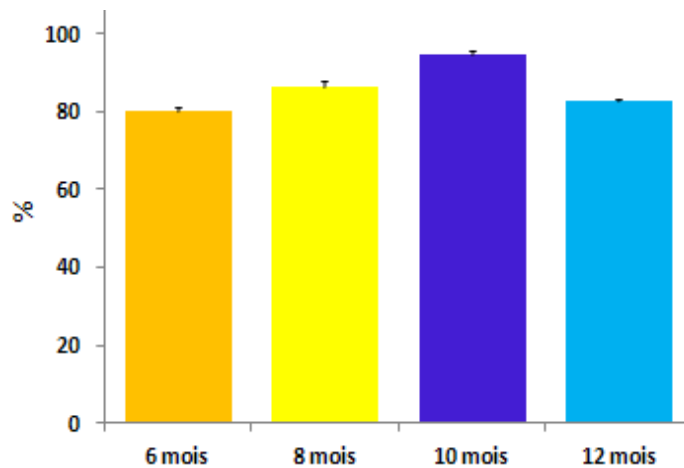


Figure 50 : Fractions d'insaturation (moyenne + erreur moyenne) au cours du suivi, en jaune : sous régime HFHS, en bleu sous régime STD.

Pour la fraction d'insaturation, aucune différence statistiquement n'est mesurée lors du changement de régime. En réponse au changement de régime alimentaire, les profils lipidiques ont significativement baissé sans qu'aucune différence significative n'ait été constatée pour la fraction d'insaturation. La fraction d'insaturation, lorsqu'elle est élevée, est un marqueur de nécrose (Corbin et al., 2009; van Werven et al., 2011).

L'impact d'un changement alimentaire sur le profil lipidique d'un modèle de glycosénose mais aussi sur les compositions lipidiques, au cours de la survenue d'adénomes a été étudié. Le profil lipidique baisse significativement, lors du changement de régime alimentaire sans modifier la composition lipidique.

### 2.3 Spectroscopie intra et péri tumoral

Cette étude a été initiée afin d'avoir des informations sur la composition et le profil lipidique des adénomes présents dans le foie des souris *L-G6pc<sup>-/-</sup>* à 12 mois. Le groupe d'animaux est composé de 5 souris modèles de glycosénose âgées de 12 mois alimentées avec un régime standard. Le voxel de spectroscopie de résonance magnétique est positionné à l'extérieur ainsi qu'à à l'intérieur d'un adénome (Figure 51). La taille du voxel est de 27mm<sup>3</sup>.

Un protocole d'acquisition des spectres identique à celui défini pour l'étude des souris à 9 mois (Chapitre II) a été utilisé, à la différence qu'aucune correction en temps de relaxation T2 n'a été appliquée.

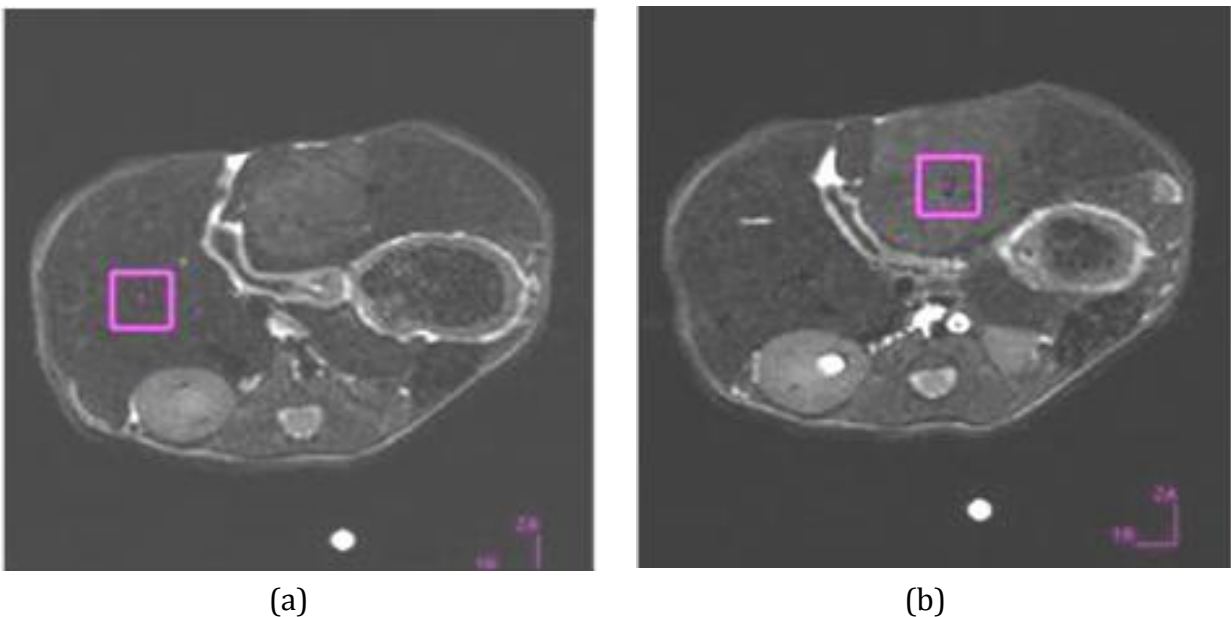


Figure 51: Positionnement des voxels de spectroscopie de résonance magnétique à l'extérieur (a) et à l'intérieur (b) d'un adénome sur une coupe axiale RARE-pondéré T2. Le voxel a une taille de 27 mm<sup>3</sup>.

### 2.3.1 Résultats

#### (a) Spectres

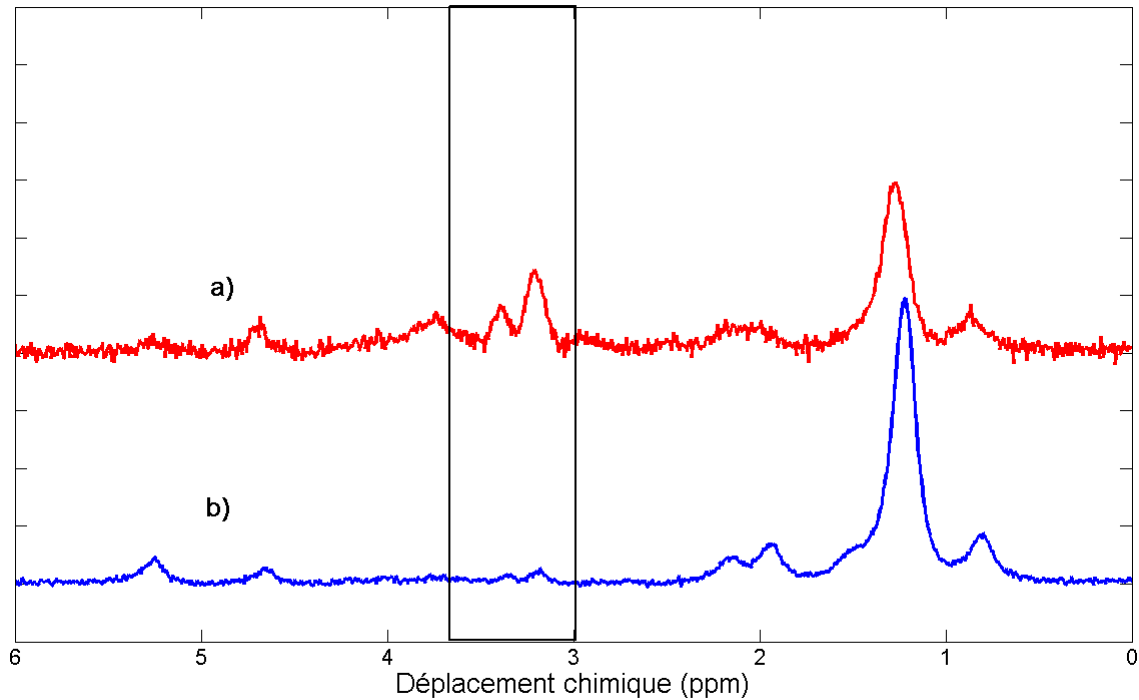


Figure 52 : Spectres issus d'une souris a) à l'intérieur d'un adénome, b) à l'extérieur d'un adénome (séquence PRESS TE/TR : 16/3000 ms, voxel : 27 mm<sup>3</sup>, NA=128), encadré en noir, la zone [3-4] ppm où sont présentes les résonances choliniques.

Les spectres sont normalisés par rapport à l'intensité de la résonance de l'eau. La zone entre 3 et 4 ppm présente une élévation des pics entre les spectres à l'intérieur et à l'extérieur de l'adénome. Pour l'analyse quantitative de ces spectres, l'algorithme MSV est utilisé. Cependant, trois composantes supplémentaires ont été rajoutées afin de modéliser les résonances choliniques (3,2 ppm, 3,5 ppm, 3,8 ppm) en plus des composantes lipidiques sélectionnées lors des quantifications précédentes.

#### (1) Profil lipidique et cholinique

Les profils lipidique et cholinique moyens sont calculés et sont présentés aux

Figure 53 et Figure 54.

Les profils lipidiques ne présentent pas de différences statistiques entre l'extérieur et l'intérieur de l'adénome ; on observe une très grande variabilité des résultats quantitatifs pour la résonance 1,3 ppm à l'intérieur d'un adénome, par contre, le taux cholinique est statistiquement plus élevé à l'intérieur de l'adénome qu'à l'extérieur. La choline est connue comme un marqueur de cancer et sa concentration est élevée dans les tumeurs par rapport au tissu sain (Kim et al., 2003).

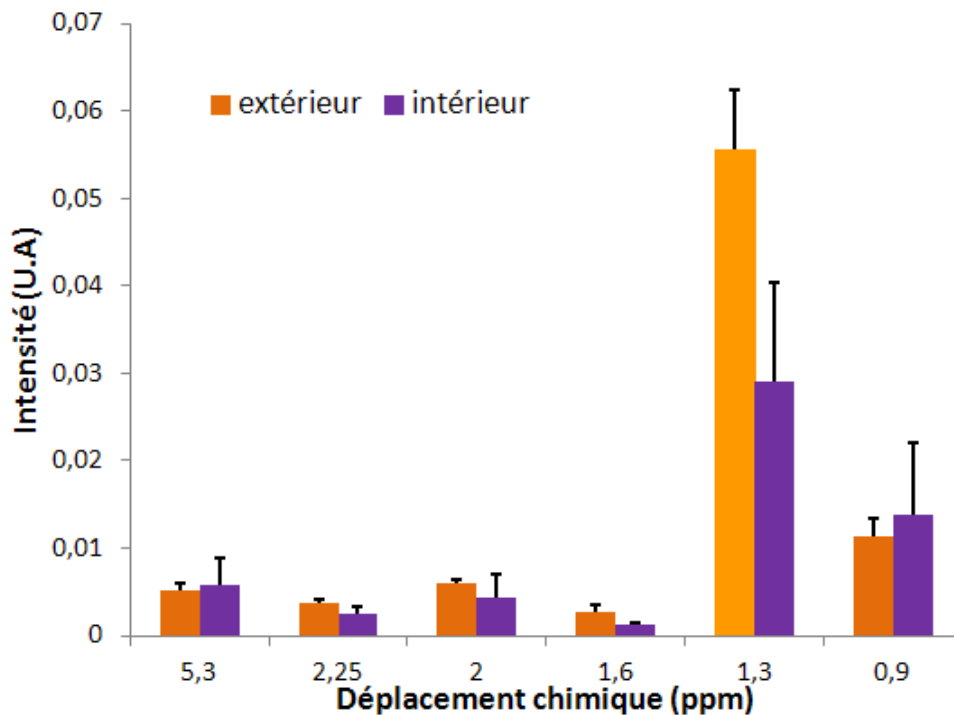


Figure 53 : Profils lipidiques moyens (moyenne  $\pm$  erreur moyenne) des différentes résonances à l'intérieur et à l'extérieur d'un adénome hépatique chez des *L-G6pc*  $-/-$  de souris sous régime standard à 12 mois.

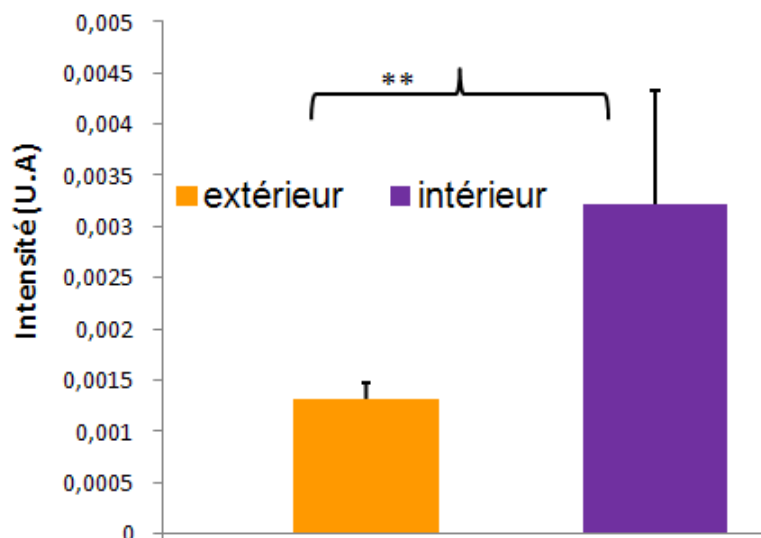


Figure 54 : Intensité (moyenne + erreur moyenne) de la choline (3,2 ppm) à l'intérieur et à l'extérieur d'un adénome.

En résumé, cette étude a permis de présenter le profil lipidique et cholinique à l'intérieur et à l'extérieur des adénomes. Si le profil lipidique ne présente pas de différence significative entre l'intérieur et l'extérieur de l'adénome, la composition cholinique diffère significativement. Une étude sur un plus grand nombre d'animaux serait intéressante à mener.

## C. Conclusion

Ce chapitre a présenté les applications de notre méthodologie dans l'étude d'un modèle de glycogénose. Les souris issues du modèle de glycogénose ont été soumises à deux régimes alimentaires et ont été comparées à leur contrôle. L'influence d'un régime riche en sucres et en gras sur ce modèle, mais également l'impact d'un changement de régime au cours du temps, ont été étudiés sur une petite population de souris. Une fois les adénomes développés, une analyse *in vivo* de la composition biochimique à l'intérieur et à l'extérieur des adénomes a été entreprise.

Dans la première application, la SRM permet de mettre en valeur la différence entre la quantité lipidique importante entre le régime alimentaire HFHS et le régime alimentaire STD chez les souris contrôles. Entre le modèle et son contrôle, pour le régime standard, l'insaturation totale est nettement plus élevée, ce qui traduit la situation pathologique chez le modèle de glycogénose, sans qu'une différence dans les composantes saturées ne soit constatée. D'ailleurs la technique de chromatographie gazeuse montre une fraction d'acides gras monoinsaturés supérieure chez le modèle sous régime standard par rapport à son contrôle. Plusieurs analyses histologiques et biochimiques restent néanmoins à réaliser, pour déterminer la présence d'une inflammation dans le foie de ces souris.



Pour la seconde application, le changement de régime alimentaire HFHS à un régime alimentaire STD a un impact sur la quantité lipidique mais ne change en rien la fraction d'insaturation une fois les adénomes installés.

Une différence significative dans le contenu cholinique et aucune différence significative sur le contenu lipidique ont été observées, entre un voxel d'origine adénomique et un voxel d'origine non-adénomique.

L'étude présente néanmoins quelques limitations :

- une variabilité inter individuelle non négligeable pour les résultats de SRM
- une correction des intensités avec les temps de relaxation moyens et non individuels, peut induire des erreurs d'estimation.

Ces applications montrent l'intérêt de la spectroscopie de résonance magnétique à haut champ, pour la caractérisation des lipides hépatiques, le suivi longitudinal lors d'un changement de régime alimentaire ou la différenciation entre un tissu sain et un tissu cancéreux.

## **Conclusion générale et perspectives**

L'objectif de cette thèse de doctorat était de développer une méthode quantitative d'exploration du foie fondée sur les techniques de SRM pour le diagnostic non invasif et fiable des pathologies hépatiques. La méthode proposée a permis une analyse des lipides *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, l'identification des sources potentielles d'artefacts pendant l'acquisition des spectres a été réalisée (gradients de brouillage, shim) et des méthodes d'ajustement ont été proposées. Les paramètres de l'algorithme de quantification MSV ont été ajustés pour une quantification optimisée des spectres *in vitro* des acides gras et des lipides hépatiques *in vivo*.

La méthodologie a été appliquée *in vitro* sur des échantillons lipidiques. Cette étude *in vitro* a permis de démontrer la faisabilité de la méthode en prouvant qu'en moyenne, les mesures d'indices caractérisant la composition des lipides observés par SRM sont en accord avec la théorie. Elle a cependant des limites : l'analyse des spectres des lipides *in vitro* a une problématique propre, sensiblement éloignée de celle des données *in vivo*. Elle nécessite une modélisation des spectres plus poussée qu'*in vivo* car ceux-ci sont bien mieux résolus et présentent des signatures spectrales complexes dues à leurs structures en multiplets. L'estimation des temps de relaxation T2 et des intensités des résonances d'intérêt s'en sont trouvées délicates à réaliser. Ainsi de fortes variabilités des mesures de rapport d'intensité de résonance ont été observées et constituent un enjeu pour les développements futurs de la méthode. Ce travail est toutefois le premier, à notre connaissance, rapportant, *in vitro*, des estimations de temps de relaxations pour les différents groupements chimiques constituant une chaîne lipidique.

La méthodologie proposée nous a permis d'obtenir les profils lipidiques du foie de la souris *in vivo* dans des conditions de stéatose induite par un régime alimentaire lié à l'obésité ou induite génétiquement. Ainsi, si la quantité lipidique ne présente aucune différence significative entre une stéatose « génétique » et une stéatose « alimentaire », la composition lipidique diffère comme le révèlent les indices. L'accès non invasif à ces indices lipidiques a pu être réalisé par le choix d'acquisition de spectroscopie RMN.

Des résultats originaux pour un modèle de glycogénose murin ont permis de mettre en évidence, par SRM, l'influence du régime alimentaire sur la composition lipidique hépatique.

Les points forts de cette étude sont :

- L'acquisition *in vivo* de spectres proton à temps d'écho court synchronisée sur la respiration de l'animal ;
- L'analyse quantitative des signaux hépatiques avec un algorithme de quantification dédié fondée sur un ajustement paramétrique de formes de raies de type « Voigt » ;
- L'estimation d'indices lipidiques traduisant la composition saturée et insaturée des lipides hépatiques ;
- L'estimation des temps de relaxation longitudinaux et transversaux des groupements chimiques des acides gras *in vitro* et des lipides hépatiques.

A défaut d'avoir un gold standard, qui est un problème récurrent pour la validation de la spectrométrie *in vivo*, nos mesures ont été confrontées aux mesures de deux autres techniques : dosages de triglycérides et technique de chromatographie gazeuse. La technique de chromatographie gazeuse a également permis de compléter les informations biochimiques à notre disposition. Une méthode de calcul a été mise en œuvre afin de pouvoir comparer les données issues des deux techniques. Une corrélation significative de 0,52 a été trouvée pour la totalité des souris ayant subi les deux techniques pour l'indice d'insaturation totale des acides gras. De plus, une diminution des composantes saturées chez les souris *L-G6pc* *-/-* trouvée par la chromatographie gazeuse est également observée en SRM.

Dans ce travail, nous avons supposé que les contributions visibles étaient majoritairement originaires des triglycérides. Cependant, d'autres métabolites contribuent, faiblement, au signal. Si cette contribution peut être considérée comme négligeable pour les cas de stéatose, la question de leur prise en compte pour les souris saine, sans stéatose reste posée. Des mesures conjointes, quantitatives, faites par SRM *in vivo* et HRMAS pour aider à avancer sur le sujet.

Enfin, les futurs axes de développements sont :

D'une part, dans la méthodologie proposée :

- l'introduction de connaissances *a priori* au sein de la fonction modèle de l'algorithme MSV permettraient de réduire les erreurs d'estimation.
- Le développement d'une stratégie multi TE utilisant la séquence PRESS :
  - Avec des impulsions de refocalisations étroites, centrées sur la résonance à 0.9ppm pour «rembobiner» le signal et éviter les évolutions dues au couplage J et permettre une meilleure estimation des temps de relaxation T2 de ce groupement méthyle, comme le mentionne Yahya and Fallone, 2010 ;
  - afin de pouvoir identifier d'autres lipides comme le cholestérol qui s'observe à des temps d'échos très court ou d'autres métabolites comme le lactate qui s'observe à des temps d'écho longs. Ces deux molécules sont intéressantes dans le cadre de modèles de cancer.

D'autre part, la méthodologie pourrait être complétée avec des acquisitions d'imagerie spectroscopique, pour obtenir la distribution spatiale des indices mesurés et des acquisitions en phosphore 31 qui permettraient d'avoir une information sur le métabolisme énergétique.

D'un point de vue biologique, il a été montré qu'une alimentation riche en graisses entraîne au bout de 15 mois des nodules chez les souris C57BL6/J (Nakamura et al., 2012). Prolonger le régime alimentaire chez les souris *L-G6pc* *-/-* et les souris C57BL6/J pourrait être envisagé afin de comparer les stigmates des adénomes entre les deux souches.

## Liste des publications

### Articles dans un journal international avec comité de lecture

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, E. Mutel, H. Guillou, G. Mithieux, F. Pilleul, F. Rajas, O. Beuf, and S. Cavassila. Hepatic lipid quantification using Magnetic Resonance Spectroscopy at 7T in a mouse model of GSD1 (*soumis à Journal of Lipid research*)

E. Mutel, A. Abdul-Wahed, **N. Ramamonjisoa**, A. Stefanutti, I. Houberton, S. Cavassila, F. Pilleul, O. Beuf, A. Penhoat, G. Mithieux, F. Rajas. Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *Journal of Hepatology, volume 54, pp 529-537, 2011*

### Conférences internationales avec comité de lecture et publication des actes

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, E. Mutel, G. Mithieux, F. Pilleul, F. Rajas, O. Beuf, and S. Cavassila, "Quantitative MR spectroscopy for lipid and metabolic measurements of GSD1 mice inside and outside liver tumor", ESMRMB Annual Meeting, Leipzig, Germany, 10/2011

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, E. Mutel, H. Guillou, G. Mithieux, F. Pilleul, F. Rajas, O. Beuf, and S. Cavassila, "Quantitative MRS lipid composition follow-up of a GSD1 mouse model subject to a diet change", ESMRMB Annual Meeting, Leipzig, Germany, 10/2011

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, E. Mutel, H. Guillou, G. Mithieux, F. Pilleul, F. Rajas, O. Beuf, and S. Cavassila, "Hepatic fatty acid quantification using MRS and GC in a mouse model of GSD1A under two different diets", ISMRM Annual Meeting, Montreal, Canada, 05/2011

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, F. Rajas, E. Mutel, F. Pilleul, O. Beuf, S. Cavassila. "In vivo hepatic localized proton magnetic resonance spectroscopy at 7T in a glycogen storage disease mouse model". Proc. Soc. Magnetic Resonance in Medicine and European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB, Stockholm, Sweden, 2010

### Conférences nationales avec comité de lecture et publication des actes

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, E. Mutel, H. Guillou, G. Mithieux, F. Pilleul, F. Rajas, O. Beuf, and S. Cavassila, "Hepatic fatty acid quantification using MRS and GC in a mouse model of GSD1A under two different diets". **Présentation orale**. RITS/GRAMM, Rennes, France, 05/2011

E Mutel, **N. Ramamonjisoa**, A Abdul-Wahed, I Houberton, S Cavassila, F Pilleul, G Mithieux, O Beuf, F Rajas. Développement d'adénomes hépatiques dans un modèle de glycoséose de type 1a. 65ème journée de l'AFEF, Paris, 2009

## **Journées scientifiques**

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, F. Rajas, F. Pilleul, S. Cavassila. O. Beuf. Spectroscopie de résonance magnétique *in vivo* du foie dans un modèle murin de glycogénose 1A à 7T dans le foie. Journées Thématiques, GDR « Imageries in vivo » (IMAGIV), CNRS, Marseille, 2010

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, F. Rajas, F. Pilleul, S. Cavassila. O. Beuf. Quantification de la stéatose hépatique chez un modèle de souris obèse et diabétique. 14ème journée scientifique de l'Ecole doctorale Inter Science – Santé, Univ Lyon 1, Lyon, 2010

**N. Ramamonjisoa**, H. Ratiney, F. Rajas, F. Pilleul, O. Beuf S. Cavassila. Spectroscopie de résonance magnétique *in vivo* d'un modèle murin de glycogénose 1a à 7 T. 13<sup>ème</sup> journée scientifique de l'Ecole doctorale Inter Science – Santé, Univ Lyon 1, Lyon, 2009

## Références bibliographiques

- <http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/generalite/chroma1.html>  
<http://www.chem.agilent.com/Library/selectionguide/Public/5989-6159FR.pdf>  
<http://www.lisa.univ-paris12.fr/~sternberg/L2-CPG/courscomplet.pdf>  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html>
- Alexander, J., M. Torbenson, et al. (2013). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease Contributes to Hepatocellular Carcinoma in Non-cirrhotic Liver: A Clinical and Pathological Study." J Gastroenterol Hepatol.
- Ali, R. and K. Cusi (2009). "New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)." Ann Med 41(4): 265-78.
- Araujo, P., Y. Zeng, et al. (2010). "Discrimination of n-3 rich oils by gas chromatography." Lipids 45(12): 1147-58.
- Araya, J., R. Rodrigo, et al. (2004). "Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Clin Sci (Lond) 106(6): 635-43.
- Asanuma, T., Y. Hirano, et al. (1999). "MR imaging of hepatic injury in the LEC rat under a high magnetic field (7.05 T)." J Vet Med Sci 61(3): 239-44.
- Bakken, I. J., I. S. Gribbestad, et al. (2001). "External standard method for the in vivo quantification of choline-containing compounds in breast tumors by proton MR spectroscopy at 1.5 Tesla." Magn Reson Med 46(1): 189-92.
- Bandsma, R. H., B. H. Prinsen, et al. (2008). "Increased de novo lipogenesis and delayed conversion of large VLDL into intermediate density lipoprotein particles contribute to hyperlipidemia in glycogen storage disease type 1a." Pediatr Res 63(6): 702-7.
- Barison, A., C. W. da Silva, et al. "A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy." Magn Reson Chem 48(8): 642-50.
- Barker, P. B., B. J. Soher, et al. (1993). "Quantitation of proton NMR spectra of the human brain using tissue water as an internal concentration reference." NMR Biomed 6(1): 89-94.
- Benhamed, F., P. D. Denechaud, et al. (2012). "The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans." J Clin Invest 122(6): 2176-94.
- Bioulac-Sage, P., J. F. Blanc, et al. (2007). "Genotype phenotype classification of hepatocellular adenoma." World J Gastroenterol 13(19): 2649-54.
- Bligh, E. and W. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol 37(8): 911-917.
- Bollard, M. E., S. Garrod, et al. (2000). "High-resolution (<sup>1</sup>H and (<sup>1</sup>H-(<sup>13</sup>C) magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver." Magn Reson Med 44(2): 201-7.
- Bottomley, P. A. (1987). "Spatial localization in NMR spectroscopy *in vivo*." Ann N Y Acad Sci 508: 333-48.
- Calderan, L., P. Marzola, et al. (2006). "*In vivo* phenotyping of the ob/ob mouse by magnetic resonance imaging and <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy." Obesity (Silver Spring) 14(3): 405-14.
- Calderaro, J., P. Labrune, et al. (2013). "Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I." J Hepatol 58(2): 350-7.

Caldwell, S. H., D. M. Crespo, et al. (2004). "Obesity and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology 127(5 Suppl 1): S97-103.

Carr, H. Y. and E. M. Purcell (1954). "Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments." Physical Review 94(3): 630-638.

Cavassila, S., H. Ratiney, et al. (2009). "Lineshape Pertinence in in vivo hepatic 1H Magnetic Resonance Spectroscopic data fitting." ESMRMB annual meeting, Antalya, Turkey.

Cha, J. Y. and J. J. Repa (2007). "The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR." J Biol Chem 282(1): 743-51.

Chen, C. Y., C. W. Li, et al. (2006). "Early response of hepatocellular carcinoma to transcatheter arterial chemoembolization: choline levels and MR diffusion constants--initial experience." Radiology 239(2): 448-56.

Cheung, J. S., S. J. Fan, et al. (2011). "In vivo lipid profiling using proton magnetic resonance spectroscopy in an experimental liver fibrosis model." Acad Radiol 18(3): 377-83.

Cho, S., M. Kim, et al. (2001). "Chronic hepatitis: in vivo proton MR spectroscopic evaluation of the liver and correlation with histopathologic findings." Radiology 221(3): 740-746.

Chou, J. Y. and B. C. Mansfield (2008). "Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease." Hum Mutat 29(7): 921-30.

Chow, A. M., D. S. Gao, et al. (2012). "Measurement of liver T(1) and T(2) relaxation times in an experimental mouse model of liver fibrosis." J Magn Reson Imaging.

Ciapaite, J., N. M. van den Broek, et al. (2011). "Differential effects of short- and long-term high-fat diet feeding on hepatic fatty acid metabolism in rats." Biochim Biophys Acta 1811(7-8): 441-51.

Cobbold, J. F., J. H. Patel, et al. (2009). "Hepatic lipid profiling in chronic hepatitis C: An *in vitro* and *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy study." J Hepatol 52(1): 16-24.

Cohen, J. C., J. D. Horton, et al. (2011). "Human fatty liver disease: old questions and new insights." Science 332(6037): 1519-23.

Conti, J. A. and N. Kemeny (1992). "Type Ia glycogenosis associated with hepatocellular carcinoma." Cancer 69(6): 1320-2.

Corbin, I. R., E. E. Furth, et al. (2009). "In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy." Biochim Biophys Acta 1791(8): 757-63.

Corbin, I. R., E. E. Furth, et al. (2009). "In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy." Biochim Biophys Acta 1791(8): 757-63.

Cudalbu, C. (2006). Estimation par spectroscopie de résonance magnétique des concentrations des métabolites cérébraux *in vivo* chez le petit animal: une analyse quantitative avec QUEST. Lyon, Université de Lyon. Doctorat: 160.

d'Assignies, G., M. Ruel, et al. (2009). "Noninvasive quantitation of human liver steatosis using magnetic resonance and bioassay methods." Eur Radiol 19(8): 2033-40.

de Alwis, N. M. and C. P. Day (2008). "Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears." J Hepatol 48 Suppl 1: S104-12.

de Graaf, R. A. and K. Nicolay (1998). "Adiabatic water suppression using frequency selective excitation." Magn Reson Med 40: 690-699.

Delgado, T. C., D. Pinheiro, et al. (2009). "Sources of hepatic triglyceride accumulation



during high-fat feeding in the healthy rat." NMR Biomed 22(3): 310-7.

Deslauriers, R., R. L. Somorjai, et al. (1988). "1H and 13C NMR studies of tissue from normal and diseased mice. Analysis of T1 and T2 relaxation profiles of triglycerides in liver." NMR Biomed 1(1): 32-43.

Deslauriers, R., R. L. Somorjai, et al. (1988). "1H and 13C NMR studies of tissue from normal and diseased mice. Analysis of T1 and T2 relaxation profiles of triglycerides in liver." NMR Biomed 1(1): 32-43.

Desmoulin, F., D. Bon, et al. (2008). "Étude critique de l'utilisation de la RMN HR-MAS pour l'analyse des tissus biologiques." comptes rendus chimie 11(4-5): 423-433.

Dimitrov, I. E., D. Douglas, et al. (2012). "In vivo determination of human breast fat composition by (1)H magnetic resonance spectroscopy at 7 T." Magn Reson Med 67(1): 20-6.

Dobbins, R. L. and C. R. Malloy (2003). "Measuring in-vivo metabolism using nuclear magnetic resonance." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 6(5): 501-9.

Donnelly, K. L., C. I. Smith, et al. (2005). "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease." J Clin Invest 115(5): 1343-51.

Duan, X. Y., L. Qiao, et al. (2012). "Clinical features of nonalcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma." Hepatobiliary Pancreat Dis Int 11(1): 18-27.

Duboc, M. (2008). Spectroscopie par résonance magnétique multi-noyaux du foie. Master Systèmes et Images. Lyon, Université Lyon1. Master: 40.

Ducheix, S., A. Montagner, et al. (2013). "Essential fatty acids deficiency promotes lipogenic gene expression and hepatic steatosis through the Liver X Receptor." J Hepatol.

Fauhl, C., F. Reniero, et al. (2000). "1H NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin." Magn Reson Chem 38: 436-443.

Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem 226(1): 497-509.

Foley, L. M., R. A. Towner, et al. (2001). "In vivo image-guided (1)H-magnetic resonance spectroscopy of the serial development of hepatocarcinogenesis in an experimental animal model." Biochim Biophys Acta 1526(3): 230-6.

Foley, L. M., R. A. Towner, et al. (2001). "In vivo image-guided (1)H-magnetic resonance spectroscopy of the serial development of hepatocarcinogenesis in an experimental animal model." Biochim Biophys Acta 1526(3): 230-6.

Frahm, J., H. Bruhn, et al. (1989). "Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo." Magn Reson Med 9(1): 79-93.

Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, et al. (2010). "A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet." J Clin Biochem Nutr 46(3): 212-23.

Gambarota, G., A. Veltien, et al. (2004). "Measurements of T1 and T2 relaxation times of colon cancer metastases in rat liver at 7 T." Magma 17(3-6): 281-7.

Garbow, J. R., X. Lin, et al. (2004). "In vivo MRS measurement of liver lipid levels in mice." J Lipid Res 45(7): 1364-71.

Garwood, M. and L. DelaBarre (2001). "The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR." J Magn Reson 153(2): 155-77.

Georgoff, P., D. Thomasson, et al. (2012). "Hydrogen-1 MR spectroscopy for measurement and diagnosis of hepatic steatosis." AJR Am J Roentgenol 199(1): 2-7.

Gillies, P., I. Marshall, et al. (2006). "Quantification of MRS data in the frequency domain

using a wavelet filter, an approximated Voigt lineshape model and prior knowledge." NMR Biomed **19**(5): 617-26.

Griffin, J. L. and J. P. Shockcor (2004). "Metabolic profiles of cancer cells." Nat Rev Cancer **4**(7): 551-61.

group, S. (1994). "The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsies in patients with chronic hepatitis C." Hepatology **20**: 15-20.

Gruetter, R. (1993). "Automatic, localized *in vivo* adjustment of all first- and second-order shim coils." Magn Reson Med **29**(6): 804-11.

Guillen, M. D. and A. Ruiz (2001). "High resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats." Trends in Food Science & Technology **12**(9): 328-338.

Guillen, M. D. and A. Ruiz (2003). "Edible oils: discrimination by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance." Journal of the Science of Food and Agriculture **83**: 338-346.

Guillen, M. D., I. Carton, et al. (2008). "Characterization of Cod Liver Oil by Spectroscopic Techniques. New Approaches for the Determination of Compositional Parameters, Acyl Groups, and Cholesterol from <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance and Fourier Transform Infrared Spectral Data." Journal of Agricultural and food chemistry **56**: 9072-9079.

Guiu, B., R. Loffroy, et al. (2009). "Mapping of liver fat with triple-echo gradient echo imaging: validation against 3.0-T proton MR spectroscopy." Eur Radiol **19**(7): 1786-1793.

Guo, X., H. Li, et al. (2012). "Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice." PLoS One **7**(6): e39286.

Guyton, A. and J. Hall (2006). Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Saunders.

Haase, A., J. Frahm, et al. (1985). "<sup>1</sup>H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging." Phys Med Biol **30**(4): 341-4.

Hamilton, G., M. S. Middleton, et al. (2009). "Effect of PRESS and STEAM sequences on magnetic resonance spectroscopic liver fat quantification." J Magn Reson Imaging **30**(1): 145-52.

Hamilton, G., T. Yokoo, et al. (2010). "*In vivo* characterization of the liver fat (<sup>1</sup>H) MR spectrum." NMR Biomed **24**(7): 784-90.

Heindryckx, F., I. Colle, et al. (2009). "Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research." Int J Exp Pathol **90**(4): 367-86.

Hines, C. D., R. Agni, et al. (2012). "Validation of MRI biomarkers of hepatic steatosis in the presence of iron overload in the ob/ob mouse." J Magn Reson Imaging.

Hu, H. H. and K. S. Nayak (2010). "Change in the proton T(1) of fat and water in mixture." Magn Reson Med **63**(2): 494-501.

Hutton, J. C. and R. M. O'Brien (2009). "Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family." J Biol Chem **284**(43): 29241-5.

Iizuka, K., R. K. Bruick, et al. (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7281-6.

Ishii, M., Y. Yoshioka, et al. (2005). "Liver fat content measured by magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla independently correlates

Ishizaka, K., N. Oyama, et al. (2011). "Comparison of <sup>1</sup>H MR spectroscopy, 3-point DIXON, and multi-echo gradient echo for measuring hepatic fat fraction." Magn Reson Med Sci **10**(1): 41-8.

Johnson, N. A., D. W. Walton, et al. (2008). "Noninvasive assessment of hepatic lipid

composition: Advancing understanding and management of fatty liver disorders." Hepatology 47(5): 1513-23.

Jung, W. (1996). "Localized Double Spin Echo Proton Spectroscopy Part I: Basic Concepts." Concepts in Magnetic Resonance, 8(1): 1-15.

Kang, J. X., J. Wang, et al. (2004). "Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids." Nature 427(6974): 504.

Keevil, S. F., B. Barbiroli, et al. (1998). "Absolute metabolite quantification by *in vivo* NMR spectroscopy: II. A multicentre trial of protocols for *in vivo* localised proton studies of human brain." Magn Reson Imaging 16(9): 1093-106.

Kim, J. K., S. H. Park, et al. (2003). "*In vivo* 1H-MRS evaluation of malignant and benign breast diseases." Breast 12(3): 179-82.

Kingsley, P. (1999). "Methods of Measuring Spin-Lattice ( T ) Relaxation 1 Times: An Annotated Bibliography." Concepts in Magnetic Resonance, 11(4): 243-276.

Kleiner, D. E., E. M. Brunt, et al. (2005). "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology 41(6): 1313-21.

Kobayashi, K., T. M. Forte, et al. (2000). "The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding." Metabolism 49(1): 22-31.

Kotronen, A., T. Seppanen-Laakso, et al. (2010). "Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum." Obesity (Silver Spring) 18(5): 937-44.

Kreis, R. (2004). "Issues of spectral quality in clinical 1H-magnetic resonance spectroscopy and a gallery of artifacts." NMR Biomed 17: 361-381.

Kubota, N., K. Tobe, et al. (2000). "Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia." Diabetes 49(11): 1880-9.

Kumashiro, N., D. M. Erion, et al. (2011). "Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." Proc Natl Acad Sci U S A 108(39): 16381-5.

Kuo, Y. T., C. W. Li, et al. (2004). "*In vivo* proton magnetic resonance spectroscopy of large focal hepatic lesions and metabolite change of hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization using 3.0-T MR scanner." J Magn Reson Imaging 19(5): 598-604.

Larson-Meyer, D. E., B. R. Newcomer, et al. (2010). "Intrahepatic and intramyocellular lipids are determinants of insulin resistance in prepubertal children." Diabetologia 54(4): 869-75.

Lawrence, C. B., D. Brough, et al. (2012). "Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide." Dis Model Mech.

lee, H. S., Q. Y. Cai, et al. (2010). *In vivo* monitoring of treatment effect of cryptotanshinone for non alcoholic fatty liver disease in mice. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Stockholm, Proceedings of the annual meeting ISMRM.

Liimatainen, T. J., A. T. Erkkila, et al. (2008). "1H MR spectroscopic imaging of phospholipase-mediated membrane lipid release in apoptotic rat glioma *in vivo*." Magn Reson Med 59(6): 1232-8.

Liimatainen, T., K. Lehtimaki, et al. (2006). "Identification of mobile cholesterol compounds in experimental gliomas by (1) H MRS *in vivo*: effects of ganciclovir-induced apoptosis on lipids." FEBS Lett 580(19): 4746-50.

Lim, S., K. R. Son, et al. (2009). "Fat in liver/muscle correlates more strongly with insulin sensitivity in rats than abdominal fat." Obesity (Silver Spring) 17(1): 188-95.

Lundbom, J., A. Hakkarainen, et al. (2010). "Characterizing human adipose tissue lipids by long echo time (1)H-MRS *in vivo* at 1.5 Tesla: validation by gas chromatography." NMR Biomed 23(5): 466-72.

Lundbom, J., A. Hakkarainen, et al. (2010). "Characterizing human adipose tissue lipids by long echo time (1)H-MRS *in vivo* at 1.5 Tesla: validation by gas chromatography." NMR Biomed 23(5): 466-72.

Lundbom, J., S. Heikkinen, et al. (2009). "PRESS echo time behavior of triglyceride resonances at 1.5T: detecting omega-3 fatty acids in adipose tissue *in vivo*." J Magn Reson 201(1): 39-47.

Machann, J., N. Stefan, et al. (2008). "(1)H MR spectroscopy of skeletal muscle, liver and bone marrow." Eur J Radiol 67(2): 275-84.

Marsman, H. A., J. R. van Werven, et al. (2010). "Noninvasive quantification of hepatic steatosis in rats using 3.0 T 1H-magnetic resonance spectroscopy." J Magn Reson Imaging 32(1): 148-54.

Martin, C., B. Riou, et al. (2006). Physiologie humaine et appliquée, Arnette Blackwell

Martinez-Granados, B., D. Monleon, et al. (2006). "Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy." NMR Biomed 19(1): 90-100.

Mehta, S. R., E. L. Thomas, et al. (2008). "Non-invasive means of measuring hepatic fat content." World J Gastroenterol 14(22): 3476-83.

Meiboom, S. and D. Gill (1958). "Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times " Rev. Sci.Instrum 29(688).

Mitchell, J., M. D. Hürlimann, et al. (2009). "A rapid measurement of T1/T2: the DECPMG sequence." J Magn Reson 200(2): 198-206.

Miyake, Y., K. Yokomizo, et al. (1998). "Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy" Journal of the American Oil Chemists' Society 75(9): 1091-1094.

Mohr, L., K. Banerjee, et al. (2008). "Transgenic overexpression of insulin receptor substrate 1 in hepatocytes enhances hepatocellular proliferation in young mice only." Hepatol Res 38(12): 1233-40.

Moraes, R. C., A. Blondet, et al. (2003). "Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses." Endocrinology 144(11): 4773-82.

Mosconi, E., M. Fontanella, et al. (2011). "Investigation of adipose tissues in Zucker rats using *in vivo* and *ex vivo* magnetic resonance spectroscopy." J Lipid Res 52(2): 330-6.

Mutel, E., A. Abdul-Wahed, et al. (2011). "Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas." J Hepatol 54(3): 529-37.

Nakamura, A., K. Tajima, et al. (2012). "Protection from non-alcoholic steatohepatitis and liver tumorigenesis in high fat-fed insulin receptor substrate-1-knockout mice despite insulin resistance." Diabetologia 55(12): 3382-91.

Nguyen (2008). Manuel d'anatomie et de physiologie. chapitre 3, P 47-49, editions Lamarre.

Nunome, Y., T. Tsuda, et al. (2010). "Determination of fatty acids in human sweat during fasting using GC/MS." Anal Sci 26(8): 917-9.

Ordidge, R. J., A. Connelly, et al. (1986). "Image-selected *in Vivo* spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective nmr spectroscopy." Journal of Magnetic Resonance 66(2): 283-294.

Orlacchio, A., F. Bolacchi, et al. (2008). "In vivo, high-field, 3-Tesla 1H MR spectroscopic assessment of liver fibrosis in HCV-correlated chronic liver disease." Radiol Med 113(2): 289-99.

Parker, P., I. Burr, et al. (1981). "Regression of hepatic adenomas in type Ia glycogen storage disease with dietary therapy." Gastroenterology 81(3): 534-6.

Patterson, A. D., O. Maurhofer, et al. (2011). "Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling." Cancer Res 71(21): 6590-600.

Peng, X. G., S. Ju, et al. (2011). "Quantification of liver fat in mice: comparing dual-echo Dixon imaging, chemical shift imaging, and 1H-MR spectroscopy." J Lipid Res 52(10): 1847-1855.

Poulet, J. B., D. M. Sima, et al. (2007). "An automated quantitation of short echo time MRS spectra in an open source software environment: AQSES." NMR Biomed 20(5): 493-504.

Preiss, D. and N. Sattar (2008). "Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations." Clin Sci (Lond) 115(5): 141-50.

Provencher, S. W. (1993). "Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra." Magn Reson Med 30(6): 672-9.

Puri, P., R. A. Baillie, et al. (2007). "A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology 46(4): 1081-90.

Rajas, F., N. Bruni, et al. (1999). "The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats." Gastroenterology 117(1): 132-9.

Ratiney, H., A. Bucur, et al. (2008). "Effective voigt model estimation using multiple random starting values and parameter bounds settings for *in vivo* hepatic 1H magnetic resonance spectroscopic data " IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro: 1529-1532.

Ratiney, H., M. Sdika, et al. (2005). "Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set." NMR Biomed 18(1): 1-13.

Ratziu, V., F. Charlotte, et al. (2005). "Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology 128(7): 1898-906.

Reeder, S. B., C. A. McKenzie, et al. (2007). "Water-fat separation with IDEAL gradient-echo imaging." J Magn Reson Imaging 25(3): 644-52.

Reeder, S. B., I. Cruite, et al. (2011). "Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy." J Magn Reson Imaging 34(4): 729-49.

Reeder, S. B., P. M. Robson, et al. (2009). "Quantification of hepatic steatosis with MRI: the effects of accurate fat spectral modeling." J Magn Reson Imaging 29(6): 1332-9.

Ren, J., A. D. Sherry, et al. (2010). "1H MRS of intramyocellular lipids in soleus muscle at 7 T: spectral simplification by using long echo times without water suppression." Magn Reson Med 64(3): 662-71.

Ren, J., I. Dimitrov, et al. (2008). "Composition of adipose tissue and marrow fat in humans by 1H NMR at 7 Tesla." J Lipid Res 49(9): 2055-62.

Rolo, A. P., J. S. Teodoro, et al. (2012). "Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." Free Radic Biol Med 52(1): 59-69.

Rustogi, R., J. Horowitz, et al. (2011). "Accuracy of MR elastography and anatomic MR imaging features in the diagnosis of severe hepatic fibrosis and cirrhosis." J Magn Reson Imaging.

Sacchi, R., F. Addeo, et al. (1997). "1H and 13C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview." Magn Reson Chem 35: 133-145.

Sakurai, M., T. Takamura, et al. (2007). "Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol 42(4): 312-7.

Scanlon, V. and T. Sanders (2007). Essentials of Anatomy and Physiology F A Davis Company.

SDBS (1997). Spectral Database for Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).

Sesti, G., M. Federici, et al. (2001). "Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders." Faseb J 15(12): 2099-111.

Sharma, P., D. R. Martin, et al. (2009). "Quantitative analysis of T2-correction in single-voxel magnetic resonance spectroscopy of hepatic lipid fraction." J Magn Reson Imaging 29(3): 629-35.

Soper, R., U. Himmelreich, et al. (2002). "Pathology of hepatocellular carcinoma and its precursors using proton magnetic resonance spectroscopy and a statistical classification strategy." Pathology 34(5): 417-22.

Specht, A., L. Fiske, et al. (2011). "Glycogen storage disease type Ia in canines: a model for human metabolic and genetic liver disease." J Biomed Biotechnol 2011: 646257.

Stanisz, G. J., E. E. Odobina, et al. (2005). "T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T." Magn Reson Med 54(3): 507-12.

Strobel, K., J. van den Hoff, et al. (2008). "Localized proton magnetic resonance spectroscopy of lipids in adipose tissue at high spatial resolution in mice *in vivo*." J Lipid Res 49(2): 473-80.

Strobel, K., J. van den Hoff, et al. (2008). "Localized proton magnetic resonance spectroscopy of lipids in adipose tissue at high spatial resolution in mice *in vivo*." J Lipid Res 49(2): 473-80.

Szczepaniak, L. S., P. Nurenberg, et al. (2005). "Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population." Am J Physiol Endocrinol Metab 288(2): E462-8.

Terpstra, M., M. Marjanska, et al. (2006). "Detection of an antioxidant profile in the human brain *in vivo* via double editing with MEGA-PRESS." Magn Reson Med 56(6): 1192-9.

Tiniakos, D. G., M. B. Vos, et al. (2010). "Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis." Annu Rev Pathol 5: 145-71.

Tkac, I., Z. Starcuk, et al. (1999). "*In vivo* 1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time." Magn Reson Med 41(4): 649-56.

Towner, R. A., S. A. Sturgeon, et al. (2002). "*In vivo* assessment of nodularin-induced hepatotoxicity in the rat using magnetic resonance techniques (MRI, MRS and EPR oximetry)." Chem Biol Interact 139(3): 231-50.

Towner, R. A., S. A. Sturgeon, et al. (2002). "*In vivo* assessment of nodularin-induced hepatotoxicity in the rat using magnetic resonance techniques (MRI, MRS and EPR oximetry)." Chem Biol Interact 139(3): 231-50.

Tranchant, J. (1996). "Chromatographie en phase gazeuse." Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation PE 1 485 - 1.

Tsuchiya, H., Y. Ebata, et al. (2013). "High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice." Metabolism 62(1): 62-9.

Tukey, J. W. (1977). Exploratory data analysis. Massachusetts Addison-Wesley.

Valenzuela, R., A. Espinosa, et al. (2012). "N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis." PLoS One 7(10): e46400.

van Werven, J. R., H. A. Marsman, et al. (2012). "Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model." Magn Reson Imaging 30(1): 112-21.

van Werven, J. R., T. C. Schreuder, et al. (2010). "Hepatic unsaturated fatty acids in patients with non-alcoholic fatty liver disease assessed by 3.0T MR spectroscopy." Eur J Radiol 75(2): e102-7.

Vanhamme, L., A. van den Boogaart, et al. (1997). "Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge." J Magn Reson 129(1): 35-43.

Wang, D. Q., L. M. Fiske, et al. (2011). "Natural history of hepatocellular adenoma formation in glycogen storage disease type I." J Pediatr 159(3): 442-6.

Weylandt, K. H., L. F. Krause, et al. (2011). "Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF-alpha." Carcinogenesis 32(6): 897-903.

with plasminogen activator inhibitor-1 and body mass index in type 2 diabetic subjects." Tohoku J. Exp. Med 206(1): 23-30.

Wolters Kluwer France.

Wu, J. W., S. P. Wang, et al. (2011). "Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis." Hepatology 54(1): 122-32.

Wu, X., Y. Tong, et al. (2011). "Lipid fatty acid profile analyses in liver and serum in rats with nonalcoholic steatohepatitis using improved gas chromatography-mass spectrometry methodology." J Agric Food Chem 59(2): 747-54.

Xu, J., J. Zhang, et al. (2009). "Metabonomics studies of intact hepatic and renal cortical tissues from diabetic db/db mice using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy." Analytical and Bioanalytical Chemistry 393(6-7): 1657-1668.

Yahya, A. and B. G. Fallone (2010). "T(2) determination of the J-coupled methyl protons of lipids: *In vivo* illustration with tibial bone marrow at 3 T." J Magn Reson Imaging 31(6): 1514-21.

Ye, Q., A. Fuchs, et al. (2011). Comparison of *in vivo* hepatic localized proton magnetic resonance spectroscopy at 9.4T on ob/ob and ob/+ mice. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Proceedings of the annual meeting ISMRM.

Yerli, H., A. M. Agildere, et al. (2007). "Evaluation of cerebral glioma grade by using normal side creatine as an internal reference in multi-voxel 1H-MR spectroscopy." Diagn Interv Radiol 13(1): 3-9.

Zadravec, D., A. Brolinson, et al. (2010). "Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity." Faseb J 24(11): 4366-77.

Zancanaro, C., R. Nano, et al. (1994). "Magnetic resonance spectroscopy investigations of brown adipose tissue and isolated brown adipocytes." J Lipid Res 35(12): 2191-9.

## Annexe

### Stratégie Cre-Lox :

La stratégie Cre-Lox se base sur l'habilité d'une enzyme (Cre recombinase) à supprimer tout fragment d'ADN se trouvant entre des séquences précises d'ADN (LoxP). Par recombinaison homologue, une première manipulation génétique permet d'insérer des sites LoxP à chaque extrémité d'un gène donné : une première génération de souris est réalisé où dans un allèle, le gène donné est flanqué de deux sites loxP. L'allèle est dit « floxé ». Une fois cette première génération de souris homozygotes vérifiée viable, les souris sont à nouveau croisées avec les souris transgéniques exprimant la Cre recombinase. Pour l'exprimer dans un tissu donné, il suffit que le gène Cre soit sous le contrôle du promoteur du gène d'une protéine ne s'exprimant que dans le tissu choisi, par exemple l'albumine pour le foie. Lorsque la «Cre recombinase» sera sécrétée, la section d'ADN comprise entre les sites loxP sera supprimée et sa fonction génétique sera inactivée. (Sénéchal, 2002; Ardaillou, 2009).

Les souris hétérozygotes pour le gène *G6pc* floxé (B6.*G6pc*<sup>lox/+</sup>) ont été croisées avec des souris exprimant la recombinase CreERT2 sous le contrôle du promoteur de la sérum albumine (B6.SA<sup>creERT2/+</sup>), conférant ainsi la spécificité hépatique d'expression de la recombinase. Les souris hétérozygotes B6.*G6pc*<sup>lox/+</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup> sont ensuite croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes B6.*G6pc*<sup>lox/lox</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup> (Figure 1-A). Afin d'induire l'excision de l'exon 3, les descendants B6.*G6pc*<sup>lox/lox</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup> et B6.*G6pc*<sup>lox/+</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup>, âgés de 6 à 8 semaines, ont reçu une injection quotidienne de tamoxifène (Sigma) (1mg dilué dans de l'huile de colza) durant 5 jours, pour obtenir les souris L-*G6pc*<sup>-/-</sup> et L-*G6pc*<sup>+/-</sup>, respectivement (Figure 1-B).



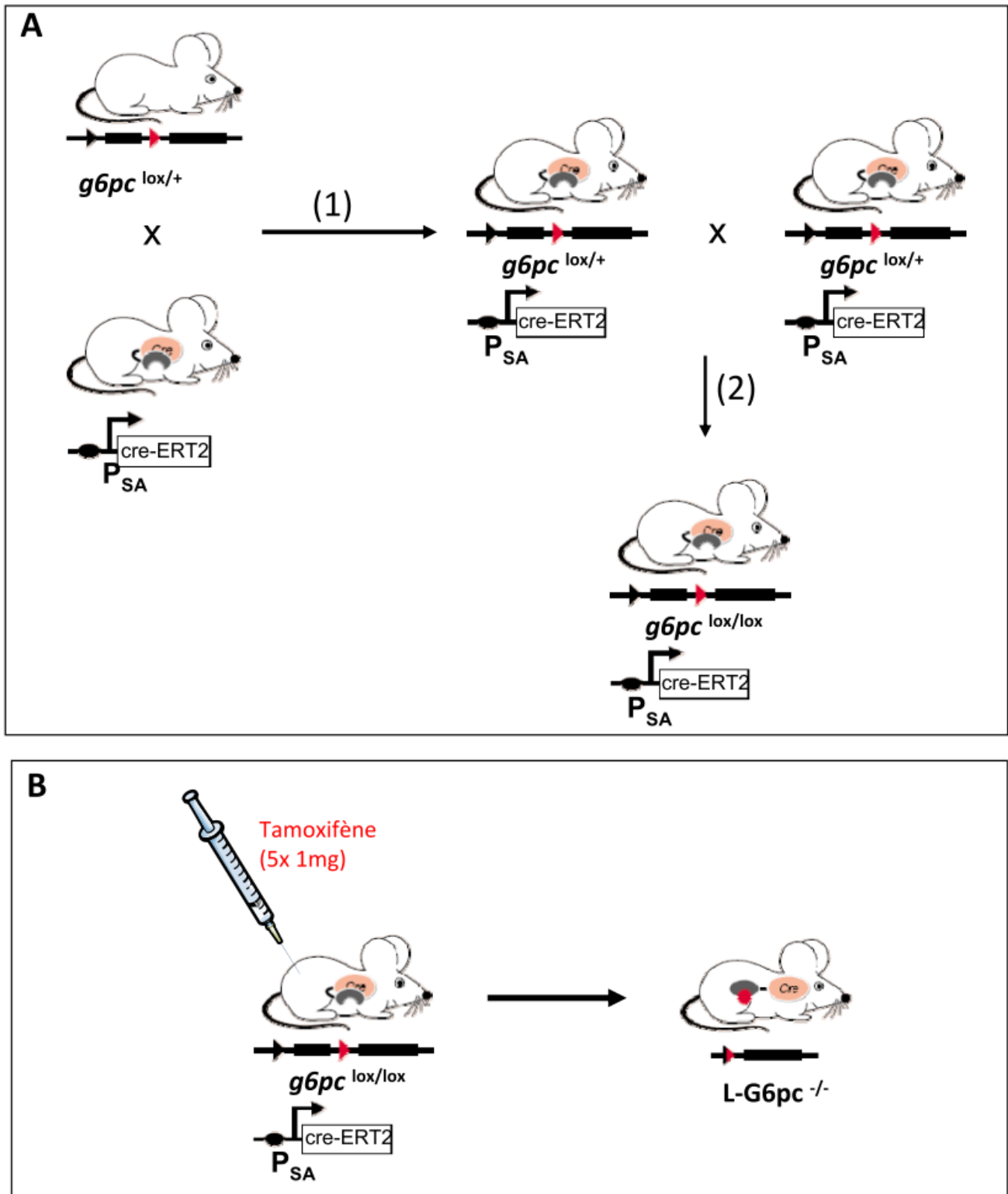


Figure 1 : (A) Croisements réalisés pour la génération des souris B6.G6pc<sup>lox/lox</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup>. (1) Croisement des souris B6.SA<sup>creERT2/+</sup> et des souris B6.G6pc<sup>lox/+</sup>. (2) Croisement des souris hétérozygotes B6.G6pc<sup>lox/+</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup> entre elles. (B) Induction de la déficience par traitement au tamoxifène des souris B6.G6pc<sup>lox/lox</sup>/SA<sup>creERT2/+</sup>. (Adapté de Babinet and Cohen-Tannoudji, 2000)

- Ardaillou, R. (2009). "[Transgenic mice: a major advance in biomedical research]." Bull Acad Natl Med **193**(8): 1773-82.
- Babinet, C. and M. Cohen-Tannoudji (2000). "Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris." médecine-sciences **16**: 31-42.
- Sénéchal, J. (2002). Vue d'ensemble des techniques usuelles en transgénèse animale Avis de la Commission de l'éthique de la science et de la technologie : Pour une gestion éthique des OGM (2003). Québec, Canada, Commission de l'éthique de la science et de la technologie.