



HAL
open science

Caractérisation d'un biomarqueur pour l'étude en tomographie par émission de positons des récepteurs muscariniques de type M2 pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer

Laura Barberis Ravasi

► **To cite this version:**

Laura Barberis Ravasi. Caractérisation d'un biomarqueur pour l'étude en tomographie par émission de positons des récepteurs muscariniques de type M2 pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S013 . tel-00651053

HAL Id: tel-00651053

<https://theses.hal.science/tel-00651053>

Submitted on 12 Dec 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille Nord de France
Faculté de Médecine

THESE

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de LILLE NORD DE FRANCE

Discipline: Neurosciences

***Caractérisation d'un biomarqueur pour
l'étude en tomographie par émission de
positons des récepteurs muscariniques de
type M2 pour le diagnostic précoce de la
maladie d'Alzheimer***

présentée et publiquement soutenue par

Mme Laura RAVASI

le 19 Septembre 2011

Membres du Jury de la Thèse:

Florence PASQUIER, Présidente - PU-PH, Lille

Franck SEMAH, Directeur - PU-PH, Lille

Monica ZILBOVICIUS, Rapporteur - DR INSERM, Paris

Alexander HAMMERS, Rapporteur - PR, Lyon

Daniel ANTHONY, Examineur - PR, Oxford

Régis BORDET, Examineur - PH-PH, Lille

*A tutti coloro che sono qui con me,
chi da più vicino, chi da meno ...*

*... à tous ceux que la Maladie d'Alzheimer touche,
les patients, leurs familles,
leurs amis ou collègues,
le personnel soignant,
notre société...*

Characterization of a positron emission tomography M2-muscarinic receptor biomarker for early in vivo diagnosis of Alzheimer's disease

Abstract

Alzheimer's disease (AD) has an increasingly critical impact on society from the socio-economic point of view in addition to being very burdensome for the patients themselves, their relatives and friends. A definitive diagnosis is only possible *post mortem* and no accurate single biomarker has yet been found for early *in vivo* diagnosis. Currently available treatments are only symptomatic. The few treatments that have been evaluated in clinical trials have so far failed to demonstrate a disease modification for either lack of actual treatment efficacy or for lack of population homogeneity and for lack of reliable *in vivo* biomarkers able to detect a modification.

In this context, there is a pressing need to identify an *in vivo* biomarker that enables i) the differential diagnosis of AD and other dementias and ii) the assessment of treatment efficacy as a follow up in AD patients.

This work aims to characterize 3-(3-(3-fluoropropylthio)-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-methylpyridine [FP-TZTP], by use of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* methodologies in rodents to assess whether it is a suitable biomarker for Alzheimer's disease.

A reduced concentration of the M2 subtype of the muscarinic receptors was noticed in AD patients and clear evidence of M2 selectivity in knock out mice previously injected with the fluorinated radiotracer FP-TZTP was observed. To further characterize such M2 selectivity, we performed *in vitro* cell culture and *ex-vivo*

tissue dipping studies (Results #1). Encouraged by the *ex vivo* results, we performed *in vivo* experiments. We elected the non-invasive nuclear medicine imaging technique Positron Emission Tomography (PET) to assess the biodistribution of [¹⁸F]FP-TZTP in rats by use of the Advanced Technology Laboratory Animal Scanner (ATLAS) developed at the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA (Results #2). We had first assessed whether the ATLAS was a suitable tool by use of a well known radiotracer, the [¹⁸F]fluorodeoxyglucose ([¹⁸F]FDG) (Results #A and #B).

Our studies suggest that [¹⁸F]FP-TZTP may be a suitable tracer for *in vivo* quantification of the M2 receptors and can be used as a biomarker for early diagnosis of AD.

Key words

Small animal imaging, positron emission tomography (PET), [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]FP-TZTP, Alzheimer's disease, biomarker, muscarinic receptors, cholinergic system

Caractérisation d'un biomarqueur pour l'étude en tomographie par émission de positons des récepteurs muscariniques de type M2 pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) a un impact socio-économique majeur. Le diagnostic n'est certain qu'à l'autopsie. Il n'existe pas de biomarqueur assurant un diagnostic précoce *in vivo*. Les quatre traitements actuellement disponibles sont symptomatiques. Les autres traitements qui ont fait l'objet d'essais de recherche clinique, n'ont pas démontré de modification de l'évolution de la maladie. Les hypothèses sous-jacentes à cet échec sont soit l'inefficacité du traitement, soit un manque d'homogénéité de la population étudiée (diagnostic différentiel parfois très compliqué), soit l'absence de biomarqueurs fiables *in vivo* en mesure de détecter une modification.

Dans ce contexte, il est essentiel d'identifier un biomarqueur *in vivo* qui permette d'établir le diagnostic différentiel entre la MA et les autres démences et d'évaluer l'efficacité des traitements.

Ce travail vise à caractériser *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* le 3 - (3 - (3-fluoropropylthio) -1,2,5-thiadiazole-4-yl) -1,2,5,6-tétrahydro-1-méthylpyridine [FP-TZTP], chez les rongeurs pour évaluer son intérêt en tant que biomarqueur potentiel pour la maladie d'Alzheimer.

Après avoir établi que l'expression du sous type M2 des récepteurs muscariniques était modifiée précocement dans la MA, nous avons mis en évidence

une distribution du radiotracteur fluoré FP-TZTP spécifique de M2 chez la souris génétiquement modifiée 'knock out'. Afin de mieux caractériser ce radiotracteur, nous avons effectué des études de culture cellulaire *in vitro* ainsi que des études *ex-vivo* sur du tissu cérébral pour comprendre la spécificité du [¹⁸F]FP-TZTP (Résultats #1). Les résultats *ex-vivo* nous ont encouragés à réaliser les études *in vivo*. Nous avons choisi la tomographie par émission de positons (TEP) qui permet l'étude *in vivo* et non invasive de la biodistribution du [¹⁸F]FP-TZTP chez le rat, en utilisant le scanner pour animaux de petite taille (ATLAS) développé par « The National Institutes of Health , Bethesda, MD, USA » (Résultats #2). Pour cela, nous avons dans un premier temps testé l'ATLAS au moyen de deux études métaboliques chez le rat, avec un traceur couramment utilisé, le [¹⁸F]fluorodéoxyglucose ([¹⁸F]FDG) (Résultats #A; Résultats #B).

Nos études suggèrent que le [¹⁸F]FP-TZTP est un traceur approprié pour la quantification en TEP des récepteurs muscariniques de type M2, utile pour le diagnostic précoce de la MA.

Mots clés

Imagerie du petit animal, tomographie à émission de positons (TEP), [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]FP-TZTP, Maladie d'Alzheimer, biomarqueur, récepteurs muscariniques, système cholinergique

Sommaire

Chapitre I. Introduction	1
1 La maladie d'Alzheimer	1
1.1 Généralités	1
1.2 Lésions pathologiques de la maladie d'Alzheimer.....	1
1.3 L'importance du diagnostic pour la maladie d'Alzheimer	2
1.4 L'aspect socio-économique de la maladie d'Alzheimer.....	3
1.5 Les traitements de la maladie d'Alzheimer.....	4
2 Le système cholinergique central.....	5
2.1 Le système muscarinique	5
2.2 Les cinq récepteurs muscariniques.....	6
2.3 Le système cholinergique et la maladie d'Alzheimer	7
3 Les biomarqueurs	8
3.1 Définition d'un biomarqueur	8
3.2 Biomarqueurs pour la maladie d'Alzheimer	8
4 Problématique et objectifs.....	13
Chapitre II. Partie expérimentale.....	20
1 Etude de caractérisation du FP-TZTP in vitro et ex-vivo.....	20
Why does the agonist [¹⁸ F]FP-TZTP bind preferentially to the M2-muscarinic receptor? (§ annexe 1).....	20
1.1 Introduction.....	20
1.2 Matériels et méthodes.....	22
1.3 Résultats.....	27
1.4 Discussion.....	33
1.5 Conclusion de l'étude.....	37
2 Validation de l'ATLAS avec le fluorodésoxyglucose marqué au F-18.....	38

2.1 Etude du métabolisme cérébral du rat sous anesthésie	38
2.2 Etude d'activation cérébrale par stimulation de vibrisses.....	52
3 Etude de caractérisation du FP-TZTP in vivo chez le rongeur.....	63
Imaging of the muscarinic acetylcholine neuroreceptor in rats with the M ₂ selective agonist [¹⁸ F]FP-TZTP (§ annexe 4).....	63
3.1 Introduction.....	63
3.2 Matériels et méthodes.....	64
3.3 Résultats.....	69
3.4 Discussion.....	80
3.5 Conclusion de l'étude.....	83
Chapitre III. Discussion	85
1 Du préclinique à la clinique.....	85
2 Perspectives de recherche	86
2.1 Considérations.....	86
Liste des illustrations	89
Tables.....	89
Figures	91
Liste des principales abréviations	93
Bibliographie.....	96
Remerciements.....	106
Annexes	107
Why does the agonist [¹⁸F]FP-TZTP bind preferentially to the M₂ muscarinic receptor? (Original article)	108
Measurement of Cerebral Glucose Metabolic Rates in the Anesthetized Rat by Dynamic Scanning with ¹⁸F-FDG, the ATLAS Small Animal PET Scanner, and Arterial Blood Sampling (Original article).....	116

Use of [¹⁸F]fluorodeoxyglucose and the ATLAS small animal PET scanner to examine cerebral functional activation by whisker stimulation in unanesthetized rats (Original article)	124
Imaging of the muscarinic acetylcholine neuroreceptor in rats with the M2 selective agonist [¹⁸F]FP-TZTP (Original article).....	131

Chapitre I. Introduction

1 La maladie d'Alzheimer

1.1 Généralités

Identifié par Alois Alzheimer en 1906, la maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neuro-dégénérative responsable d'un déclin progressif des fonctions cognitives et mnésiques. L'altération intellectuelle s'accompagne de troubles psychologiques et comportementaux dont le retentissement sur la vie quotidienne des malades est majeur, avec, à terme, une perte totale d'autonomie. En 1984, pour la première fois, le National Institute of Neurological Disorders and Stroke et l'Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) a mis en place des critères pour définir la MA.

1.2 Lésions pathologiques de la maladie d'Alzheimer

Les lésions pathologiques de la MA sont les plaques amyloïdes (plaques séniles) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Masters, Simms et al. 1985). Ces lésions sont associées à des phénomènes inflammatoires neuronaux, et ensemble elles provoquent une dysfonction puis une dégénérescence neuronale accélérée.

Le peptide A β est le principal constituant des plaques amyloïdes. Il provient de la coupure par des sécrétases de l'*amyloid precursor protein* (APP) et est constitué, en fonction des sites de coupure enzymatique par les sécrétases, de 38 à 43 acides aminés. Il existe des formes N-tronquées, N-40 et N-42, qui composeraient les plaques amyloïdes initiales et pourraient représenter plus de 60% des composants des formes d'A β cérébral (Sergeant, Bombois et al. 2003). En raison de sa faible solubilité, ce peptide s'accumule

dans l'espace extracellulaire et s'agrège progressivement pour former les plaques amyloïdes. Ces plaques sont également retrouvées dans la démence à Corps de Lewy (DCL) ou dans d'autres pathologies amyloïdes vasculaires (angiopathie amyloïde cérébrale) ou musculaires (myosite à inclusion).

Les DNF sont principalement constituées de protéines *tubulin associated unit (tau)*. Il existe 6 isoformes différents de *tau* produits par épissage alternatif. Physiologiquement, les protéines *tau* sont attachées à la tubuline qui joue un rôle majeur dans la structure des neurones et le phénomène de transport. Ces protéines permettent l'assemblage et la stabilisation des microtubules, dont la régulation est médiée par la phosphorylation de *tau* par des kinases. Une hyperphosphorylation sur des sites inhabituels rend la protéine *tau* non-fonctionnelle, ce qui conduit à son agrégation intra-neuronale. Les DNF sont également retrouvées dans d'autres maladies neuro-dégénératives, telles que certaines démences fronto-temporales (DFT), la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale ou la dystrophie myotonique de Steinert.

1.3 L'importance du diagnostic pour la maladie d'Alzheimer

La possibilité de poser un diagnostic fiable est la première étape afin de faire bénéficier au patient des meilleures thérapeutiques existantes et d'instaurer au plus tôt une prise en charge adaptée. Pour ce faire, des critères cliniques internationaux ont été établis et validés à partir de grandes études cliniques et anatomopathologiques. Cependant, le « gold standard » pour établir un diagnostic de certitude est l'examen anatomopathologique (à l'exception des cas d'évidence génétique). De plus, les différentes démences partagent certaines caractéristiques cliniques, ce qui rend l'identification de l'étiologie de la démence parfois difficile. Comme diagnostic différentiel, nous devons évoquer la démence vasculaire (DVas), principale cause de démence non neuro-dégénérative; parmi les démences d'origine neuro-dégénérative, la démence à corps de Lewy avec une fréquence estimée à 20% (Rahkonen, Eloniemi-Sulkava et al. 2003) ainsi que la DFT, la démence sémantique et l'aphasie primaire progressive.

Les seuls critères cliniques peuvent parfois être insuffisants pour établir le diagnostic étiologique comme le reporte une étude clinique sur 56 patients où 77% des 26 patients qui avaient les critères pour un diagnostic de DFT remplissaient aussi ceux du NINCDS-ADRDA pour la MA (Varma, Snowden et al. 1999). De même, la MA peut aussi être confondue avec la DCL puisque ces deux affections ont en commun l'atteinte mnésique et celle des fonctions exécutives et attentionnelles. La sensibilité et la spécificité du diagnostic posé sur des critères cliniques sont variables (49-100% en sensibilité et 47-100% en spécificité pour le diagnostic de MA probable selon les critères NINCDS-ADRDA et DSM-IV) (Knopman, DeKosky et al. 2001). Selon les mêmes critères, le diagnostic de MA possible aurait une sensibilité variant de 85 à 96% et une spécificité de 32 à 61%. Les mêmes auteurs reportent une sensibilité de 20 à 89% et une spécificité de 64 à 98% pour le diagnostic de DVas selon les critères du NINCDS-AIREN. Pour le diagnostic de DCL selon les critères publiés (McKeith, Ballard et al. 2000), Knopman et al. reportent enfin une sensibilité variant de 34 à 75% et une spécificité de 71 à 94%.

Ces données confirment la faiblesse des critères de jugement cliniques actuels. La découverte de nouveaux critères clinico-biologiques est indispensable pour sensibiliser et affiner le diagnostic étiologique des démences.

1.4 L'aspect socio-économique de la maladie d'Alzheimer

La MA représente également un problème socio-économique puisqu'elle est actuellement la plus importante cause de démence neuro-dégénérative. Deux tiers des démences sont liées à une MA, elle affecte un sujet sur trois de plus de 85 ans dans les pays industrialisés (Ferri, Prince et al. 2005) et le 6-8% des personnes de plus de 65 ans. En 2007, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé à 18 millions et en 2010 à 35,6 millions le nombre de personnes atteintes de MA dans le monde entier, dont environ 860000 en France. Selon des études prédictives basées sur le vieillissement de la population (Ferri, Prince et al. 2005), ces chiffres devraient doubler d'ici 20 ans, pour atteindre 65,7 millions en 2030, 80 millions en 2040 et 115,4 millions en 2050. D'un point de vue financier, une étude (Wimo, Jonsson et al. 2011) a estimé à 177 d'euros milliards le

coût global (coûts directs et soins informels) de cette démence en 2008 en Europe et à 422 milliards de dollars (310 milliards d'euros), dont 142 milliards de dollars (34%) celui relatif au coût global en 2009 dans le monde entier (Wimo, Winblad et al. 2010). Ce montant représente une augmentation de 33% par rapport aux 315 milliards de dollars dépensés en 2005. Dans un rapport de 2005 sur la MA et les syndromes apparentés, l'office parlementaire d'évaluation des politiques de santé (OPEPS) avait estimé à plus de 9 milliards d'euros (soit le 0.5% du Produit Intérieur Brut de l'année 2005, Source: Insee, comptes nationaux, base 2005) la charge financière annuelle que représente l'ensemble des ressources mobilisées pour la prise en charge de la maladie en France et selon ses estimations, ces dépenses pourraient s'accroître de plus de 50% à l'horizon 2020. Un récent rapport de l'Alzheimer Association (website de référence http://www.alz.org/alzheimers_disease_trajectory) a étudié différentes évolutions possibles pour cette maladie d'ici 2050. Une intervention hypothétique en mesure de retarder l'apparition de la démence de 5 ans se traduirait par une réduction de 57% du nombre de patients souffrant de MA, le cout projeté global passerait de 627 à 344 milliards de dollars. Actuellement, le risque qu'une personne de 65 ans développe une MA est estimé à 10,5%. Les études statistiques suggèrent qu'un instrument de dépistage des marqueurs du processus physiopathologique de la MA (avec une sensibilité et une spécificité de 90%) et un traitement visant à ralentir de moitié la progression de maladie, permettrait de réduire ce risque à 5,7% (rapport publié par l'Alzheimer Association sur http://www.alz.org/alzheimers_disease_trajectory).

1.5 Les traitements de la maladie d'Alzheimer

Actuellement, le traitement symptomatique des formes légères à modérées de la MA repose sur les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Dans les études à court et à long terme, les trois inhibiteurs de la cholinestérase les plus couramment utilisés, le donépézil, la rivastigmine et la galantamine, ont démontré leur efficacité au point de vue cognitif, et également fonctionnel et comportemental chez les patients souffrant de formes légères à sévères de MA (Shah, Lee et al. 2008). Cependant, malgré certains avantages des inhibiteurs de la cholinestérase dans le traitement sur l'ensemble des symptômes

associés à la MA, la pathologie sous-jacente continue de progresser alors même que les patients reçoivent un traitement. Bien que la stabilisation temporaire ait été observée, des cas d'amélioration, même modeste, sont rarement décrits. De plus, les effets secondaires du traitement par inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (nausée, diarrhée, dyspepsie, rougeur du visage) peuvent être sévères et non tolérés par les patients (Shah, Lee et al. 2008). Par conséquent, des traitements complémentaires pour la MA doivent être développés pour élargir l'arsenal thérapeutique encore trop modeste.

2 Le système cholinergique central

Le système cholinergique central est un système de neurotransmission complexe qui prend son nom du transmetteur chimique qui le stimule: l'acétylcholine (ACh). L'ACh agit sur deux types différents de récepteurs – les récepteurs nicotiques et les récepteurs muscariniques, caractérisés par la capacité de fixation des agonistes muscariniques ou nicotiques, respectivement. Les voies principales du système cholinergique central sont les suivantes: (i) des voies du prosencéphale basal assurant l'innervation de l'hippocampe, du cortex cingulaire et de quelques noyaux sous corticaux, (ii) des voies partant du tronc cérébral pour innerver d'autres régions du tronc ou de l'hypothalamus ou le thalamus, et (iii) des interneurons, principalement au niveau striatal mais également présents au niveau du noyau accumbens.

2.1 Le système muscarinique

Phylogénétiquement, l'ACh est une ancienne molécule neurochimique, impliquée dans les processus qui sous-tendent certaines de nos fonctions les plus élémentaires telles que le sommeil, la cognition, le contrôle moteur et le traitement sensoriel (Sarter and Bruno 1997). L'altération de la transmission cholinergique au sein du système muscarinique est impliquée dans la physiopathologie des troubles psychiatriques comme

la schizophrénie, le trouble bipolaire, le trouble dépressif majeur et l'abus de substances, ainsi que de maladies neurologiques telles que la MA et la maladie de Parkinson.

2.2 Les cinq récepteurs muscariniques

La famille des récepteurs muscariniques se compose de cinq récepteurs métabotropiques, M1, M2, M3, M4, et M5. Après activation, ils déclenchent une réponse en cascade dans les neurones qui les expriment, via la libération intra cellulaire de seconds messagers. Les récepteurs M1, 3 et 5 sont couplés aux protéines G par les sous-unités $\alpha_q/11$ conduisant à l'activation de la phospholipase C (Fig. 1). Au contraire, les récepteurs M2 et M4, sont couplés aux protéines G par les sous-unités α_i/o , ce qui entraîne l'inhibition de l'adénylcyclase. En plus de leurs voies de signalisation canonique, les récepteurs muscariniques sont capables d'activer de multiples voies de transduction du signal. Par exemple, les récepteurs M1, M3 et M5 peuvent stimuler les voies impliquant la phospholipase A2, la phospholipase D, la tyrosine kinase ainsi que les canaux calciques. Les récepteurs M2 et M4, en plus de l'inhibition de l'adénylcyclase, peuvent également utiliser la phospholipase A2 comme second messenger (Felder 1995). La localisation des récepteurs muscariniques a fait l'objet de nombreuses études (Scarr 2011). Le sous-type M1 est présent principalement au niveau des régions corticales au niveau post synaptique des neurones pyramidaux. Les récepteurs M2 sont exprimés dans l'ensemble du cerveau, à la fois au niveau des membranes pré et post synaptiques, à des concentrations variables (élevée au niveau du noyau basal et du cortex occipital; plus faible au niveau de l'hippocampe, du putamen et du noyau caudé). Toutefois, les récepteurs M2 sont également présents dans un sous-ensemble des synapses glutamatergiques et dans les interneurones GABAergiques (Mrzljak, Levey et al. 1998). Ainsi, près d'un tiers des neurones GABAergiques corticaux expriment des récepteurs M2 (Disney and Aoki 2008). Les récepteurs M3 montrent une distribution similaire à celle des récepteurs M1, mais leur niveau d'expression est plus faible. Les récepteurs M4 sont surtout exprimés au niveau du noyau caudé et du putamen, où ils sont souvent associés aux récepteurs dopaminergiques. Les récepteurs M5, très faiblement exprimés, se trouvent au niveau de l'hippocampe, du locus niger, et de l'aire tegmentale ventrale.

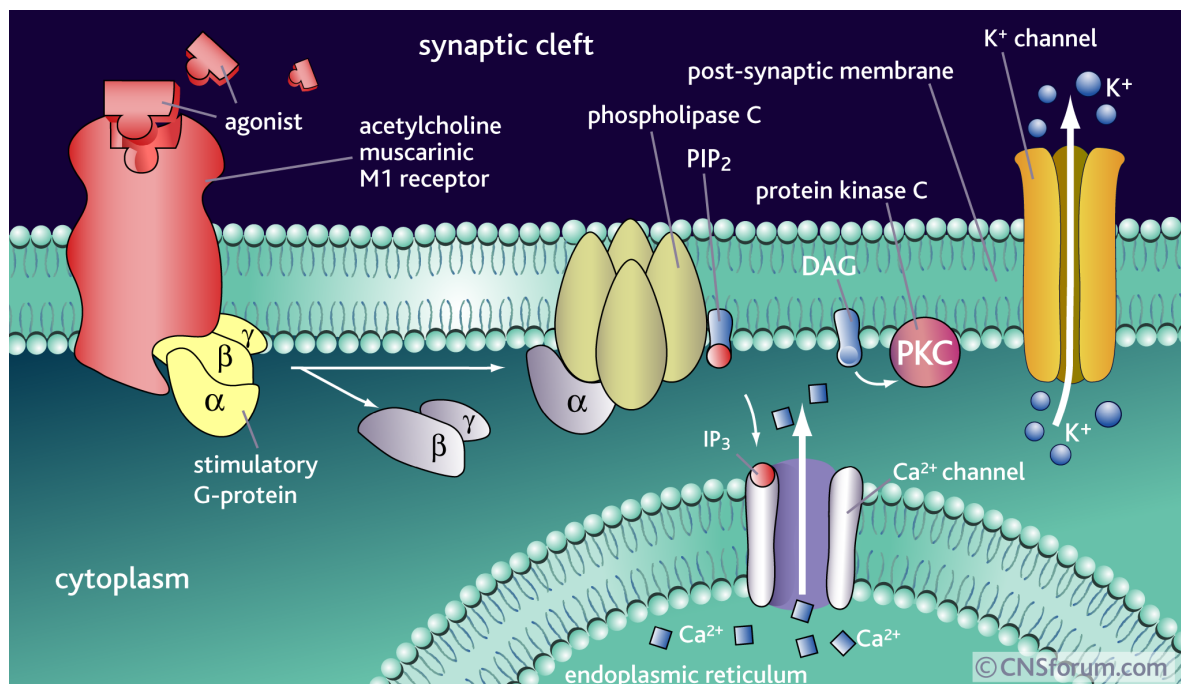


Figure 1. Muscarinic receptor agonist from CNSforum.com

The acetylcholine muscarinic M1 receptor is the most abundant sub-type of the acetylcholine receptor in the brain. When an agonist, such as acetylcholine, binds to this receptor a series of down-stream signaling mechanisms or secondary messengers are initiated. This results in the opening of potassium channels and the propagation of a nerve impulse.

Récepteur muscarinique

Le sous-type M1 est le plus abondant des récepteurs cholinergiques muscariniques au niveau cérébral. Quand un agoniste, tel que l'Acétylcholine, se lie au récepteur, une série de mécanismes se déclenchent directement ou *via* des seconds messagers.

2.3 Le système cholinergique et la maladie d'Alzheimer

Les équipes ayant étudié les altérations de marqueurs cholinergiques dans le cerveau des patients souffrant de MA ont suggéré qu'il existe une diminution des voies cholinergiques corticales et de l'hippocampe alors que les voies striatales semblent relativement épargnées.

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, en ralentissant la dégradation de l'ACh, augmentent le taux de cette dernière au niveau synaptique, et le traitement par inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est actuellement validé dans la prise en charge des

troubles cognitifs. Malheureusement, l'efficacité clinique de ces médicaments est modeste, probablement en raison de la dégénérescence des neurones cholinergiques centraux.

Au point de vue des différents sous-types de récepteurs, la littérature est parfois contradictoire, probablement en raison de l'absence de ligands spécifiques de chaque sous type de récepteur et de la différence de gravité de la MA chez les patients étudiés. Malgré les résultats divergents de certaines études, la majorité des données indiquent que le système central muscarinique est perturbé dans la physiopathologie de la MA.

3 Les biomarqueurs

3.1 Définition d'un biomarqueur

Dans le domaine médical, un biomarqueur est un test diagnostique biologique en rapport avec la maladie sous-jacente, qui peut être utilisé pour le dépistage médical (recherche d'une maladie dans une population), le diagnostic (caractérisation d'une maladie chez un individu) ou la réponse à un traitement. Il doit être fiable, précis et reproductible. Il doit provenir d'un geste non ou modérément invasif comme la ponction lombaire et avoir une sensibilité et une spécificité d'au moins 80% (Aging working group 1998).

3.2 Biomarqueurs pour la maladie d'Alzheimer

Depuis fin 2007, l'utilisation de biomarqueurs est recommandée dans les nouveaux critères diagnostiques internationaux de la MA, avec l'imagerie fonctionnelle de médecine nucléaire et l'imagerie radiologique conventionnelle par résonance magnétique (IRM).

3.2.1 Biomarqueurs biologiques dérivés du liquide céphalorachidien

Il existe trois biomarqueurs dosés dans le liquide céphalorachidien (LCR), obtenus par ponction lombaire, qui reflètent les lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA: le peptide amyloïde A β -42, la protéine *tau* totale (ou protéine MAPT pour Microtubule Associated Protéin Tau) et les protéines *tau* hyperphosphorylées (PTau). Un profil de ces biomarqueurs « en faveur » de la MA se compose d'un taux de peptide amyloïde A β -42 abaissé, un taux de protéine *tau* élevée (2-3 fois supérieur aux valeurs de référence) et un taux de protéine tau hyperphosphorylée augmentée. Il existe également des index de ratios de ces taux qui permettent d'augmenter la fiabilité de l'ensemble de ces trois indicateurs (ex. Index IATI). Cependant, l'utilisation des biomarqueurs du LCR pour le diagnostic différentiel de la MA dans le cadre d'un syndrome démentiel est délicat puisque ces taux peuvent varier également dans d'autres démences (van Harten, Kester et al. 2011). Une récente revue (Prvulovic and Hampel 2011) reporte les nombreuses études qui ont calculé la sensibilité et spécificité des biomarqueurs à la fois pour poser un diagnostic (jusqu'à 90% et 85%, respectivement) et en tant qu'éléments prédictifs au stade asymptomatique de MA (95% et 83%, respectivement).

3.2.2 Biomarqueurs d'imagerie

3.2.2.1 L'imagerie morphologique conventionnelle

a) L'atrophie en tant que biomarqueur

L'IRM cérébrale est toujours préférable au scanner cérébral en l'absence de contre-indication à l'exposition au champ magnétique. Toutefois, la tomодensitométrie à rayons X est l'examen de première intention pour éliminer les causes de démences chirurgicales. Dans les démences neurodégénératives de type Alzheimer, l'imagerie par IRM montre une atrophie temporale médiale prédominante, en particulier au niveau de l'hippocampe (Frisoni, Fox et al. 2010) et la mesure de l'épaisseur corticale permet d'identifier les patients au stade prodromal de MA (Desikan, Cabral et al. 2009).

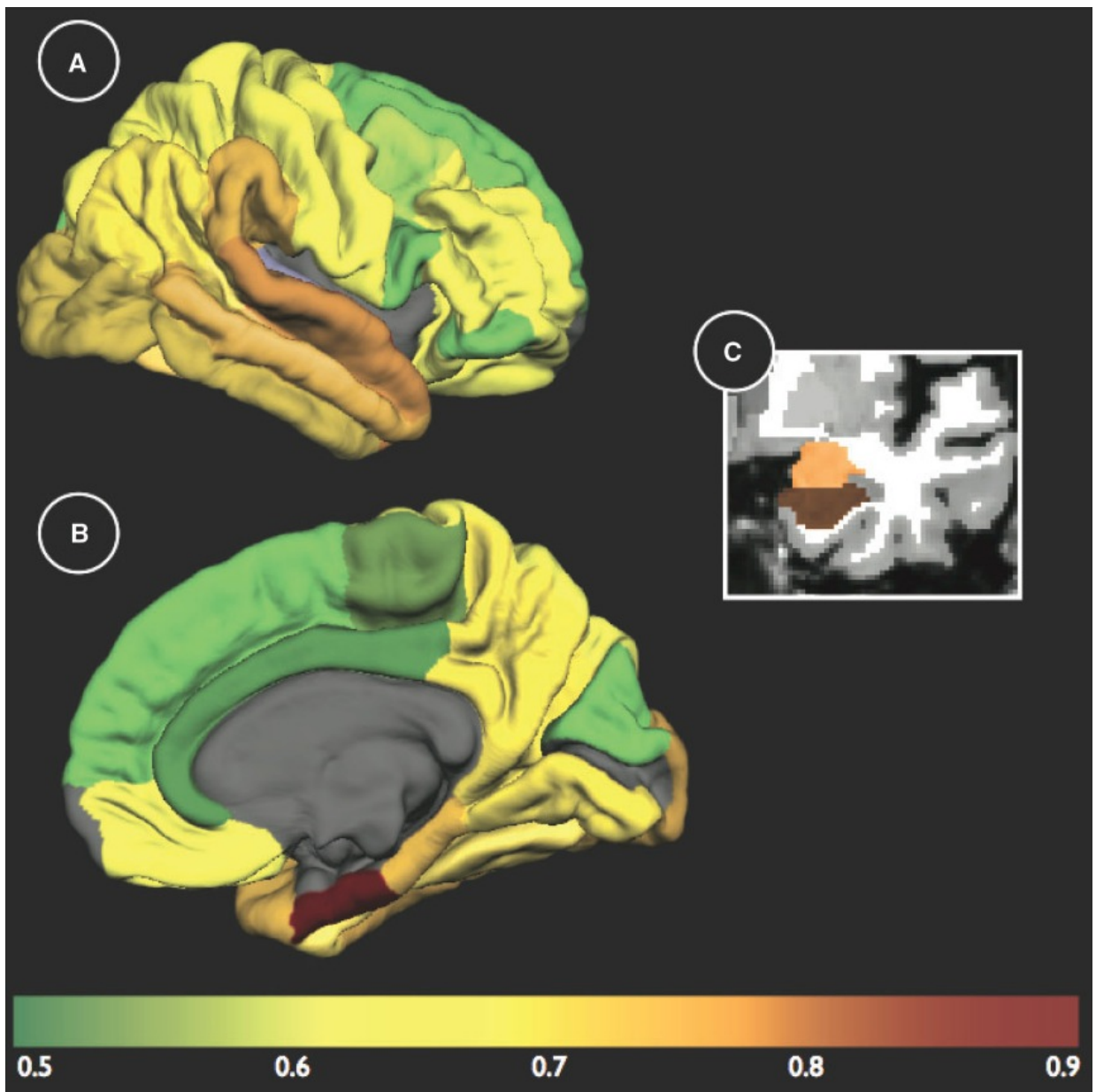


Figure 2. MRI cortical thickness measurements from Desikan, Cabral et al. 2009

AUC results (neocortical thickness and non-neocortical volumes) from the first regression model (MCI versus older controls) for all of the automated ROIs from the training cohort (OASIS subjects) displayed on the grey matter surface (only one hemisphere is shown) in (A) lateral, (B) medial views and (C) the two non-neocortical regions (i.e. the hippocampus and amygdala) in the coronal view of a T1-weighted MRI image. The colour scale at the bottom represents the discrimination accuracy (AUC value), with green indicating regions of lowest discrimination and brown/red indicating regions of highest discrimination.

Mesure de l'épaisseur corticale par IRM (extrait de Desikan, Cabral et al. 2009)

Comparaison de l'épaisseur corticale d'une population de MCI avec une population de volontaires sains âgés.

3.2.2.2 L'imagerie fonctionnelle

a) La perfusion cérébrale en tant que biomarqueur

La perfusion cérébrale est généralement étudiée grâce à l'injection de Hexamethyl Propylene Amine Oxime (HMPAO) ou de LL-ethyl cysteinatate dimer (ECD), après marquage au Technetium 99m ($[^{99m}\text{Tc}]$). Les images de perfusion sont obtenues grâce à la tomographie à émission monophotonique (TEMP). Il existe un profil assez caractéristique des atteintes fonctionnelles dans la MA identifié sous la forme d'hypoperfusions intéressant le cortex temporo-pariétal (Jagust, Thisted et al. 2001) et parfois aussi une hypoperfusion frontale (O'Brien, Eagger et al. 1992; Imran, Kawashima et al. 1999).

b) Le métabolisme cérébral en tant que biomarqueur

Le métabolisme cérébral est un indice direct de la densité et de la fonction synaptique (Sokoloff 1977; Attwell and Iadecola 2002). Les lésions principales de la MA, les plaques amyloïdes et les DNF, présentes bien avant les manifestations cliniques (Braak and Braak 1991; Delacourte, David et al. 1999) s'associent à une désorganisation des circuits cérébraux avec perte synaptique et mort neuronale dans les régions les plus vulnérables (Morrison and Hof 1997). Les régions touchées en premier sont les lobes temporaux médiaux (hippocampe, gyrus parahippocampique, cortex transentorhinal et entorhinal) (Braak and Braak 1991; Delacourte, David et al. 1999). Dans ces régions, ce sont les neurones à large projection (qui ont donc un axone long) qui sont les plus endommagés. En effet, ces neurones sont dépendants d'une part d'un apport de glucose élevé et constant pour fonctionner et d'autre part d'un transport axonal antérograde et rétrograde. L'étude du métabolisme cérébral permet d'observer la présence de régions où la perte synaptique se traduit par la réduction de la consommation de glucose (Aubert, Araujo et al. 1992; Attwell and Iadecola 2002).

La distribution typique du traceur métabolique en cas de MA est caractérisée par une hypofixation du fluorodésoxyglucose ($[^{18}\text{F}]$ FDG) au niveau du cortex pariéto-occipital

(Friedland, Budinger et al. 1983), du cortex cingulaire postérieur (Minoshima, Giordani et al. 1997) ainsi qu'au niveau du cortex frontal (DeKosky and Scheff 1990) (Fig. 3).

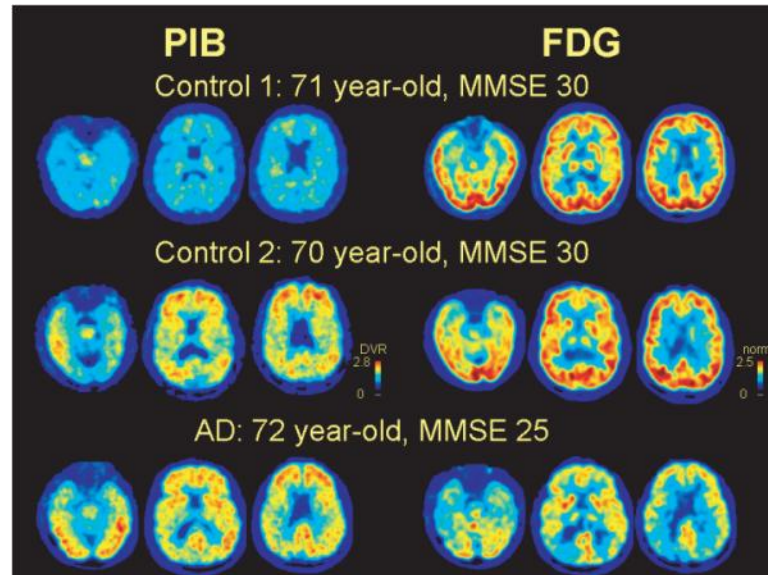


Figure 3. PIB and FDG in controls and Alzheimer's disease (AD) from Rabinovici and Jagust, 2009.

Control 1 demonstrates only non-specific PIB binding to white matter (top row, left), while Control 2 shows diffuse cortical and striatal PIB binding (middle row, left) that is indistinguishable from binding in a patient with AD (bottom row, left). However, only the AD patient demonstrates reduced glucose metabolism on FDG-PET (bottom row, right), whereas both controls show intact resting metabolism (top and middle row, right). PIB images are parametric distribution volume ratio (DVR) images using a cerebellar reference region, while FDG images are normalized to mean activity in pons; MMSE – Mini-Mental State Exam.

Distribution de PIB et FDG chez des volontaires sains et des patients avec MA, extrait de Desikan, Cabral et al. 2009.

Control 1 : Distribution du PIB non spécifique au niveau de la matière blanche.

Control 2 : Distribution du PIB au niveau cortical et striatal, similaire à celle chez le patient avec MA. Cependant, la distribution du FDG n'est anormale que chez ce dernier.

c) Les plaques amyloïdes en tant que biomarqueur

La caractéristique neuropathologique des plaques séniles a ouvert la voie à l'étude des traceurs spécifiques des plaques amyloïdes (Nordberg 2004). L'équipe de Pittsburg (Klunk, Engler et al. 2004) a montré la présence de plaque amyloïde par l'injection de PiB marqué au carbone-11 (Fig. 3) chez des patients avec DCL et MA, plus tard confirmé par

les études anatomopathologiques. D'autres traceurs pour l'amyloïde marqués au F 18, le Flutemetamol, le Florbetapir et le Florbetaben, le FDDNP, ont montré des résultats intéressants *in vitro* et chez l'animal et leur distribution a été évaluée chez l'humain, et comparé avec celle du PiB ou aux études histo-pathologiques (Herholz and Ebmeier 2011).

Actuellement, ces traceurs sont en cours d'évaluation non seulement pour diagnostiquer la présence de dépôts d'amyloïde au niveau cérébral mais aussi pour mesurer l'efficacité des potentiels traitements anti-amyloïdes pour la MA (Rinne, Brooks et al. 2010).

4 Problématique et objectifs

Les biomarqueurs énoncés ci-dessus viennent étoffer un faisceau d'arguments diagnostiques en complément des approches cliniques et neuropsychologiques, mais ne permettent pas encore un diagnostic précoce et de certitude *ante mortem* de la MA.

La précocité du diagnostic est liée à la possibilité de trouver un biomarqueur qui détecte une des modifications à l'origine des déséquilibres qui se mettent en place lors de la MA. Nous nous sommes intéressés au système cholinergique, en particulier aux différents sous-types des récepteurs muscariniques centraux. Plusieurs études ont reporté une perte du sous-type M2 au niveau du cortex cérébral dans la MA alors que le sous-type M1 était préservé (Quirion, Aubert et al. 1989; Aubert, Araujo et al. 1992; Rodriguez-Puertas, Pascual et al. 1997). Cette constatation a poussé d'autres équipes à chercher un ligand sélectif de M2, qui, marqué avec un radionucléide émetteur de positons, permettrait de déterminer la densité des récepteurs du sous-type M2 dans le cerveau humain *in vivo*. Cependant, presque aucun traceur cholinergique n'a démontré la sélectivité par sous-type et ceux qui sont sélectifs pour un sous-type *in vitro* ne sont généralement pas en mesure de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Le 3 - ((3 - (3-fluoro-propyl) thio) -1,2,5-thiadiazole-4-yl) -1,2,5,6-tétrahydro-1-méthylpyridine (FP-TZTP), un agoniste muscarinique basé sur une série d'analogues non-fluorés (Sauerberg, Olesen et al. 1992)(Sauerberg, et al. 1992) a été radiomarqué avec le radionuclide ^{18}F émettant des positons (^{18}F FP-TZTP)(Fig. 4)(Kiesewetter, Lee et al. 1995).

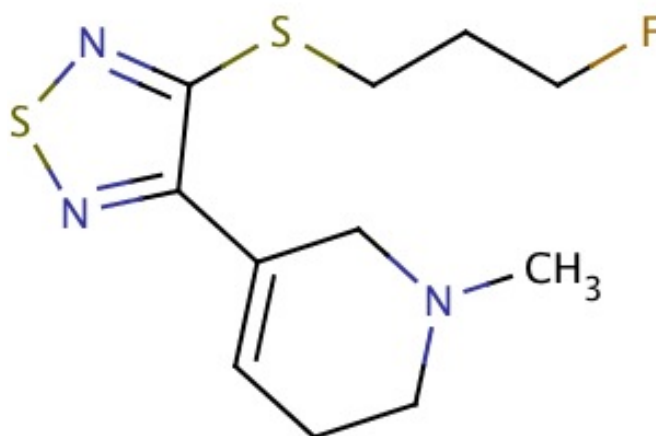


Figure 4. Chemical structure of FP-TZTP.

3-(3-(3-Fluoropropyl)thio)-1,2,5- thiadiazol-4-yl)-1,2,5,6-tetrahydro-1- methylpyridine

Structure chimique de FP-TZTP.

3-(3-(3-Fluoropropyl)thio)-1,2,5- thiadiazol-4-yl)-1,2,5,6-tetrahydro-1- methylpyridine

Dans un premier temps, nous avons voulu tester ce ligand *in vivo* pour vérifier sa biodistribution et son passage à travers la BHE. Nous avons injecté le ^{18}F FP-TZTP chez des souris normales (WT) et des souris génétiquement modifiées (Knock out M1, M2, M3, M4). A la fin de la biodistribution du radiotraceur, nous avons sacrifié les souris. Après extraction, le cerveau a été coupé en tranches pour l'évaluation et la quantification, par méthode autoradiographique, de la fixation du ^{18}F FP-TZTP. Celle-ci était significativement diminuée (51,3 à 61,4%, $p < 0,01$) chez la souris KO M2 par rapport au

type sauvage (WT) au niveau des régions suivantes: l'amygdale, le tronc cérébral, le noyau caudé/putamen, le cervelet, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le colliculus supérieur et le thalamus (Fig. 5, 6).

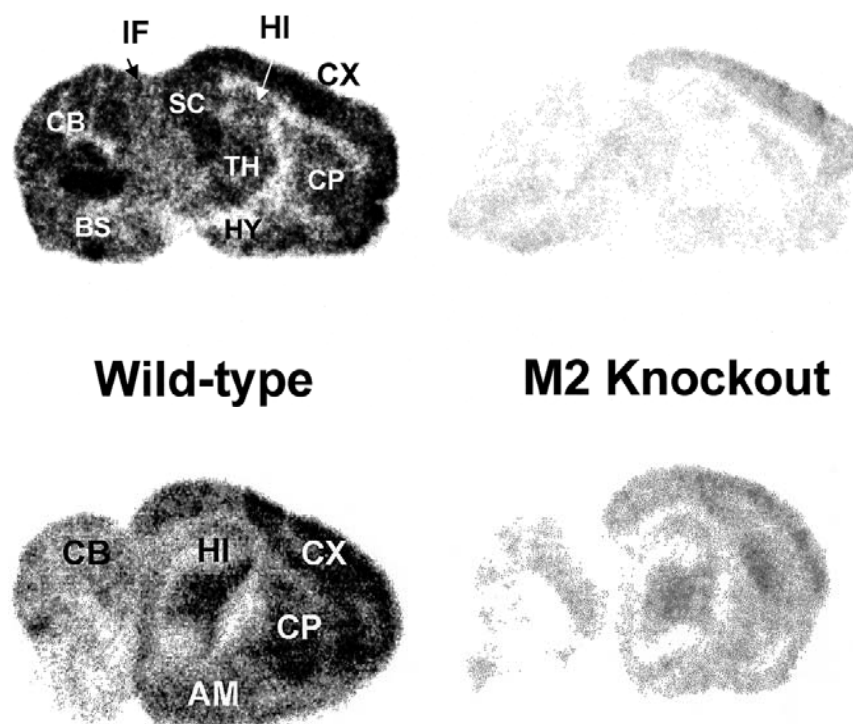


Figure 5. [^{18}F]FP-TZTP autoradiography.

Representative brain autoradiographs of [^{18}F]FP-TZTP in M2 KO compared to WT mouse at 30 min after iv injection of 300 μCi . Top: Saggital slice 1.8 mm from the midline. Bottom: Saggital slice 3.9 mm from the midline.

Autoradiographie avec [^{18}F]FP-TZTP.

Autoradiographies de coupes sagittales cérébrales de souris M2 KO comparées avec celles de souris WT, 30 minutes après injection de 300 μCi .

Dans des études similaires avec M1KO, M3KO et M4KO par rapport aux souris WT, la fixation du radioligand dans les mêmes régions cérébrales n'avait pas diminué de façon significative (Fig. 7-9). Cette étude (Jagoda, Kiesewetter et al. 2003) nous a permis de conclure que le [^{18}F]FP-TZTP se distribue préférentiellement au niveau des récepteurs M2 *in vivo*.

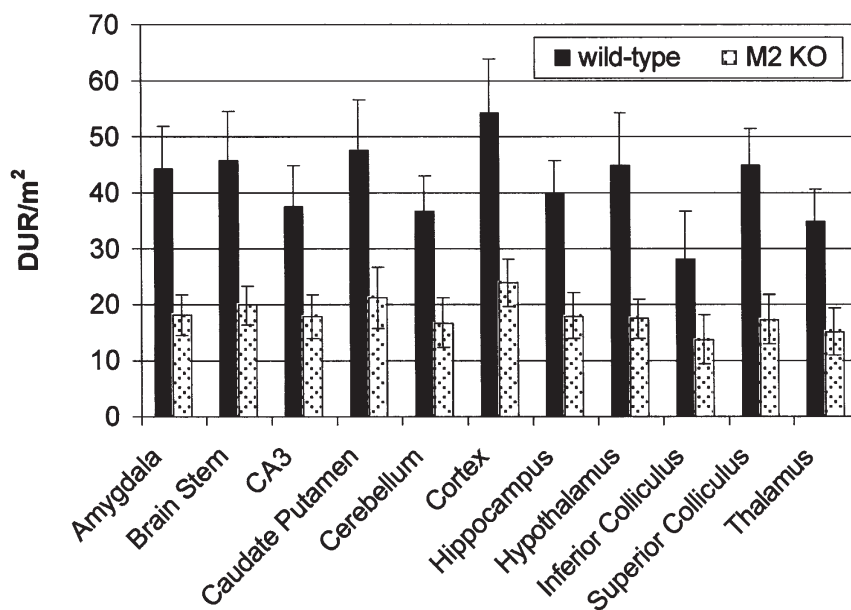


Figure 6. Regional brain localization of [18F]FP-TZTP in M2 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μ Ci.

Data represents the mean Dose Uptake Ratio (DUR)/m² \pm SD; n=4-5 mice; p<000.5 for all regions except inferior colliculus. p<0.015 using Student *t* test.

Distribution régionale de [18F]FP-TZTP au niveau cérébral chez des souris M2 KO comparées avec celles de souris WT, après injection de 300 μ Ci.

Données exprimées en Dose Uptake Ratio (DUR)/m² \pm SD; n=4-5; p<000.5 pour toutes les régions sauf le colliculus inférieur où p<0.015 avec un *t* test de Student.

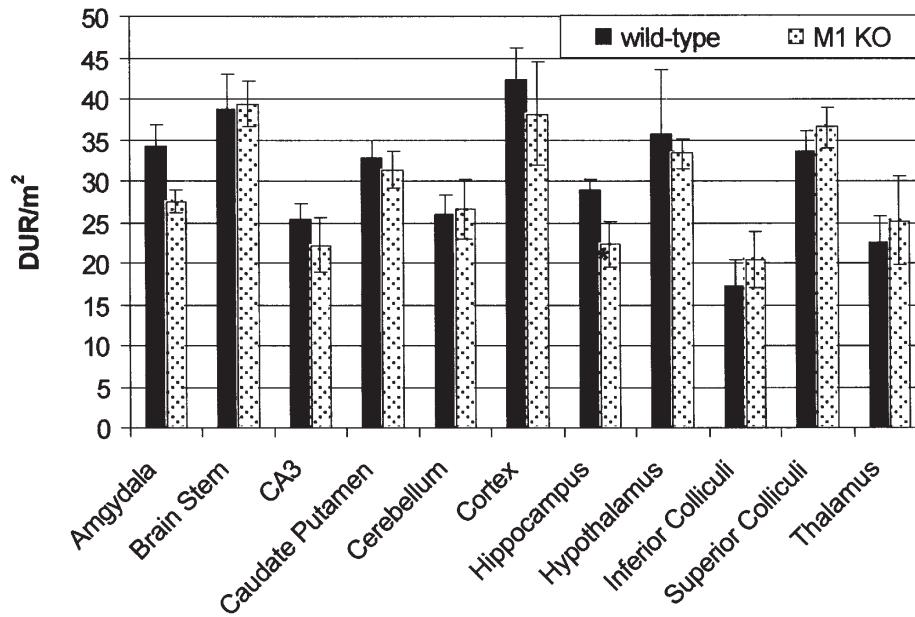


Figure 7. Regional brain localization of [18F]FP-TZTP in M1 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μ Ci.

Data represents the mean DUR/m² \pm SD; n=5 mice.

Distribution régionale de [18F]FP-TZTP au niveau cérébral chez des souris M1 KO comparées avec celles de souris WT, après injection de 300 μ Ci.

Données exprimées en (DUR)/m² \pm SD; n=5.

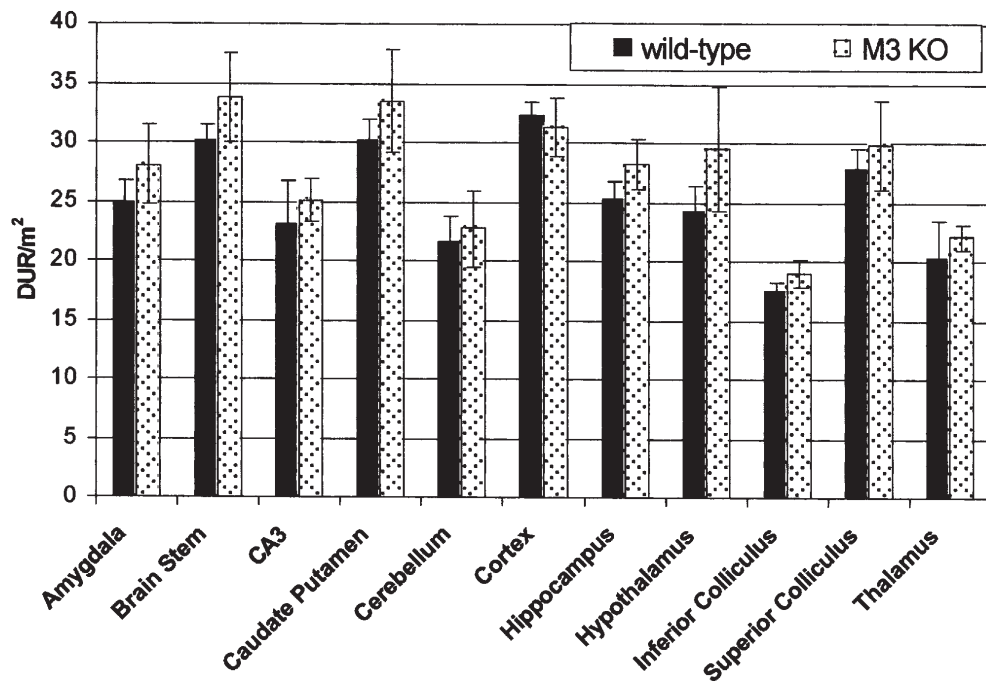


Figure 8. Regional brain localization of $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ in M3 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μCi .

Data represents the mean $\text{DUR}/\text{m}^2 \pm \text{SD}$; $n=5$ mice.

Distribution régionale de $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ au niveau cérébral chez des souris M3 KO comparées avec celles de souris WT, après injection de 300 μCi .

Données exprimées en $(\text{DUR})/\text{m}^2 \pm \text{SD}$; $n=5$.

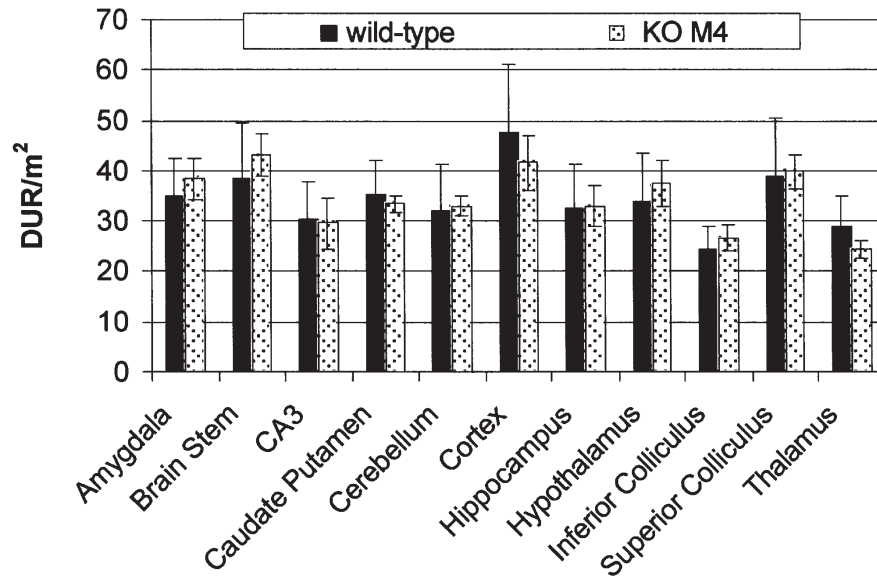


Figure 9. Regional brain localization of [18F]FP-TZTP in M4 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μ Ci.

Data represents the mean DUR/m² \pm SD; n=5 mice.

Distribution régionale de [18F]FP-TZTP au niveau cérébral chez des souris M4 KO comparées avec celles de souris WT, après injection de 300 μ Ci.

Données exprimées en (DUR)/m² \pm SD; n=5.

Chapitre II. Partie expérimentale

Le but de ce travail a été de caractériser le [¹⁸F]FP-TZTP afin de comprendre son mécanisme de sélectivité pour les récepteurs M2 *in vivo*.

1 Etude de caractérisation du FP-TZTP in vitro et ex-vivo

Why does the agonist [¹⁸F]FP-TZTP bind preferentially to the M2-muscarinic receptor? (§ annexe 1)

1.1 Introduction

Les symptômes de plusieurs maladies du cerveau humain sont dus à un changement dans le nombre ou l'efficacité des neurorécepteurs ou un changement dans la concentration des neurotransmetteurs synaptiques. Le système de neurotransmission cholinergique muscarinique semble être impliqué dans plusieurs troubles neurologiques, y compris la MA, la maladie de Parkinson, la dépression et la schizophrénie (Friedman 2004). La MA a un effet dévastateur sur la mémoire et les fonctions cognitives chez les personnes âgées. Le traitement le plus fréquemment utilisé en clinique se base sur «l'hypothèse cholinergique» (Bartus, Dean et al. 1982; Coyle, Price et al. 1983) et emploie des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Nordberg and Svensson 1998). Cinq sous-types de récepteurs muscariniques ont été identifiés, et un changement de densité des récepteurs dans la MA a été observé dans de nombreuses études autoptiques (Mash, Flynn et al. 1985; Quirion, Aubert et al. 1989; Li, Yasuda et al. 1991; Levey 1993). Pour étudier les systèmes de neurotransmission chez l'Homme au moyen des techniques d'imagerie moléculaire, des traceurs ont été synthétisés et validés comme radiotraceurs

ciblant sélectivement un type de récepteurs (Eckelman 1995; Vera and Eckelman 2001). En ce qui concerne les récepteurs muscariniques centraux, plusieurs antagonistes ont été étudiés. Parmi ceux marqués avec l'Iode 123, on retrouve le quinuclidinyl benzilate ($[^{123}\text{I}]\text{IQNB}$) (Eckelman, Eng et al. 1985), et parmi ceux marqués avec le Carbone 11, on retrouve le $[^{11}\text{C}]\text{benztropine}$ (Dewey, MacGregor et al. 1990), la $[^{11}\text{C}]\text{oxotrémorine}$ et la $[^{11}\text{C}]\text{scopolamine}$ (Frey, Koeppe et al. 1992), et le $[^{11}\text{C}]\text{tropanyl Benzilate}$ (Koeppe, Frey et al. 1994). Bien que les composés étudiés pour favoriser la compréhension du système muscarinique soient nombreux, la sélectivité par sous-type de récepteur n'a été démontrée chez le rat que pour le IQNB (Gibson, Moody et al. 1992).

En 1992, une équipe (Sauerberg, Olesen et al. 1992) a préparé plusieurs composés sélectifs des différents sous-types et un de ces 3-propylthio-(1,2,5 - thiadiazole-4-yl) - 1,2,5,6-tétrahydro-1-méthylpyridine (PT ZTP), a servi en tant que composé parent pour la synthèse d'un analogue radiofluoré (Kiesewetter, Lee et al. 1995). L'analogue radiofluoré, 3 - (3 - (3 - $[^{18}\text{F}]\text{fluoro}$) thio) -1,2,5-thiadiazole-4-yl) -1,2,5,6-tétrahydro-1-méthylpyridine (FP-TZTP), a été étudié *in vivo* chez les rats (Kiesewetter, Lee et al. 1995), les singes (Carson, Kiesewetter et al. 1998; Kiesewetter, Carson et al. 1999), les souris (Jagoda, Kiesewetter et al. 2003), et chez l'Homme (Cohen, Podruchny et al. 2003; Podruchny, Connolly et al. 2003). L'absorption au niveau du cerveau de FP-TZTP résultant de son d'extraction très élevée au premier passage (Carson, Kiesewetter et al. 1998; Shimoji, Esaki et al. 2003) combinée avec la démonstration de sa liaison préférentielle pour le récepteur M2 en utilisant des souris knockout (Jagoda, Kiesewetter et al. 2003) a conduit à une enquête sur le FP-TZTP comme traceur TEP potentiel pour la MA, dans laquelle une réduction substantielle des récepteurs M2 a été observée (Aubert, Araujo et al. 1992; Flynn and Mash 1993). Les deux études chez le volontaire sain ont montré que la liaison de $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ augmentait avec l'âge et la présence de l'allèle $\epsilon 4$ pour l'apolipoprotéine (APOE $\epsilon 4$). Ceci indique que les changements mesurés à travers $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ seraient relatifs à l'acétylcholine endogène plutôt qu'à la densité des récepteurs (Cohen, Podruchny et al. 2003; Podruchny, Connolly et al. 2003).

Cette étude a pour but d'explorer, *in vitro*, les mécanismes responsables de la sélectivité pour le sous-type M2 de FP-TZTP démontrée *in vivo* (Jagoda, Kiesewetter et al. 2003). Un mécanisme potentiel est l'internalisation du récepteur qui entraîne l'absorption et la rétention accrue (van Koppen and Kaiser 2003). Nous avons utilisé des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), exprimant les différents récepteurs muscariniques humains, afin d'évaluer la liaison à l'équilibre *in vitro* de [¹⁸F]FP-TZTP en fonction de différents sous-types de récepteurs. Par l'utilisation des produits chimiques non radiomarqués FP-TZTP et N-méthyl atropine, nous avons pu différencier la liaison spécifique interne de celle spécifique externe dans les cellules CHO. Le tissu cérébral de rat, en tant que modèle plus réaliste, a également été examiné pour déterminer si la liaison à l'équilibre était sous-type dépendant et la méthode par autoradiographie a été utilisée pour analyser les phénomènes de dissociation *in vitro*.

1.2 Matériels et méthodes

Produits chimiques

La [³H](+)- pentazocine (activité spécifique: 42,5 Ci/mmol) et la (+)- pentazocine (Mr 285,43) ont été obtenues d'Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). L'atropine bromure de méthyle (m-A) (Mr 384,3 g) a été achetée chez Sigma (St Louis, MO). Les autres produits (Dulbecco's modified Eagle medium, sérum de veau fœtal, la L-glutamine, généticine, la pénicilline G, et la streptomycine) ont été achetés auprès GibcoBRL (Long Island, NY). L'oxalate FP-TZTP (Mr 349) a été préparé comme précédemment décrit (Sauerberg, et al. 1992). [¹⁸F]FP-TZTP a été synthétisé dans le service "PET" du Centre Clinique au "National Institutes of Health", selon une procédure précédemment publié (Kiesewetter, Vuong et al. 2003). L'activité spécifique allait de 5328 à 7352 Ci/mmol à la fin du bombardement.

Etudes cellulaires *in vitro*

La culture cellulaire et la récolte

Les cellules CHO, transfectées de façon stable avec les récepteurs humains mAChR M1 (cellules CHO M1), M2 mAChR (cellules CHO M2), M3 mAChR (cellules CHO M3), M4 mAChR (cellules CHO M4), M5 mAChR (CHO cellules M5), ainsi que le type sauvage de cellules CHO ont été fournies par le Dr J. Wess (NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Les cellules ont été cultivées et maintenues dans le milieu de Dulbecco modifié par Eagle supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 100 mg/ml de pénicilline, 100 pg/ml de streptomycine et 2 MML-glutamine à 37°C dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO₂:95% d'O₂. Les cellules ont été repiquées par trypsinisation selon le taux de croissance. Cinquante pg/ml de généticine étaient inclus dans le milieu tous les dix passages pour garantir la pureté de chaque clone.

Le jour avant le dosage, tous les clones qui avaient atteint le 100% de confluence étaient transférés dans des plaques stériles à six puits et placés dans les incubateurs mentionnés ci-dessus pendant la nuit. Un comptage non-stérile des cellules était réalisé pour chaque puits.

Pour toutes les études, les solutions étaient préparées le matin même, selon les dosages suivants: solution de dosage (10% du *phosphate buffered saline* (PBS) 0,125 M MgCl₂ 0,225 M CaCl₂) et solution *sodium dodecyl sulfate* SDS (SDS 5% 10 mM TRIS 1 mM EDTA).

Etudes de liaison à l'équilibre

Des expériences ont été effectuées sur les cellules entières et intactes M1, M2, M3, M4, M5 et CHO. A température ambiante, le milieu de culture a été retiré des plaques à six puits. Chaque puits a été rincé deux fois avec 1 ml de solution de dosage. Tous les puits ont reçu [¹⁸F]FP-TZTP (1-2 nM) dilué dans 1 ml de solution de dosage. Vingt-cinq microlitres de produits inhibiteurs (soit m-A soit FP-TZTP) ont donc été ajouté à certains

puits pour obtenir une concentration finale de $10^{-4}M$. Afin de déterminer si la liaison était fondée sur un mécanisme ATP-dépendant, les dosages ont été effectués à la fois à $37^{\circ}C$ pendant 30 min et à $4^{\circ}C$ pendant 2 h. A la fin du temps d'incubation, les plaques ont été placées sur de la glace et le surnageant a été enlevé. Les puits ont été lavés deux fois avec 1 ml de solution de dosage glacée. 1 ml de solution SDS glacée a été ajouté à chaque puits. Après environ 5 min, les cellules ont été recueillies auprès de chaque puits et transférées dans des flacons. Les puits ont été lavés deux fois avec 0,5 ml de PBS glacé, qui a été ajouté au flacon correspondant. Les fioles ont été comptées sur compteur gamma (modèle Assistant 1480; Perkin Elmer Life Sciences Inc, Boston, MA, USA) pendant 60s. Lorsque le test a été exécuté à $4^{\circ}C$, toutes les solutions ont été ajoutées à froid et conservées sur la glace, alors que pour les tests à $37^{\circ}C$ toutes les solutions ajoutées étaient maintenues à température ambiante, y compris le rinçage initial avec la solution de dosage. Pour chaque essai, un puits a été laissé sans traitement afin de l'utiliser pour quantifier le nombre réel de cellules à travers un comptage de cellules.

Calcul et mesure des liaisons

Nous avons conçu nos tests afin de mesurer les paramètres suffisants pour résoudre l'équation $TB = SB + NSB$, où TB est synonyme de liaison totale (*Total Binding*), SB est synonyme de liaison spécifique (*Specific Binding*), et NSB est synonyme de liaison non spécifique (*Non Specific Binding*). Puisque les récepteurs M2 sont exprimés sur le côté extérieur de la membrane cellulaire mais ils sont également présents à l'intérieur du cytoplasme, nous avons distingué le SB interne (S_{Bi}) et SB externe (S_{Be}). Notre équation devient $TB = S_{Bi} + S_{Be} + NSB$.

1. Mesure de la liaison totale (TB):

Nous avons utilisé le total du signal radioactif collecté par les cellules traitées seulement avec [^{18}F]FP-TZTP (1-2 nM) en tant que mesure pour le TB.

2. Mesure de la liaison non spécifique (NSB):

Puisque FP-TZTP est capable de traverser la membrane cellulaire, nous avons ajouté 10^{-4} M de FP-TZTP avec [^{18}F]FP-TZTP aux puits dans lesquels nous voulions calculer la NSB totale.

3. Calcul de la liaison spécifique (SB):

Pour calculer la liaison spécifique, nous avons soustrait la NSB du TB. Il en est résulté SB totale (soit $\text{SBi} + \text{SBe}$) = $\text{TB} - \text{NSB}$.

4. Calcul de la liaison externe spécifique (SBe):

Les études de compétition ont été effectuées avec [^{18}F]FP-TZTP et 10^{-4}M m-A. Puisque m-A ne peut pas traverser la membrane cellulaire, nous avons été en mesure de bloquer la SBe de sorte à ce que la radioactivité émise par les cellules incubées avec [^{18}F]FP-TZTP et m-A puisse correspondre à la somme de NSB et du SBi. Ainsi, la SBe a été calculée à partir de l'équation $\text{SBe} = \text{TB} - (\text{NSB} + \text{SBi})$.

5. Calcul de la liaison spécifique interne (SBi):

La liaison interne spécifique a ensuite été résolue selon l'équation $\text{SBi} = \text{SB} - \text{SBe}$.

Etudes de liaison par saturation

Puisque les cellules contiennent des récepteurs sigma WT, en plus de récepteurs M2, des expériences ont été réalisées sur WT-CHO et M2-CHO cellules intactes, en présence de [^{18}F]FP-TZTP (1-2 nM) et des concentrations de FP-TZTP ou (+)-pentazocine (allant de 10^{-10} à 10^{-6} M) ou de [^3H](+)-pentazocine (2-3 nM) avec des concentrations variables de FP-TZTP ou (+)-pentazocine (allant de 10^{-10} à 10^{-6} M) pendant 90 min à 37°C . L'oxalate FP-TZTP a été dissous dans l'éthanol: eau 1:2 et d'autres dilutions successives avec de l'eau ont abouti aux concentrations souhaitées. La (+) pentazocine a été dissoute dans l'éthanol: eau 2:1 et des dilutions en série avec 10 mM HCl ont donné les concentrations souhaitées. La liaison non spécifique a été déterminée en utilisant des doses de blocage de FP-TZTP et de la (+)-pentazocine (à hauteur de 10^{-5} M). Les analyses ont été effectuées en

utilisant la même procédure que celle détaillée ci-dessus dans les études de liaison à l'équilibre. Pour les tests en utilisant la [³H](+)- pentazocine, 4 ml de cocktail de scintillation a été ajouté à chaque flacon utilisé pour collecter les cellules. Vingt-quatre heures plus tard, les flacons ont été comptés sur un bêta-compteur (modèle 2200CA Packard, Long Island Scientific, Inc, Jefferson, NY, USA). Les données ont été analysées avec Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Californie, USA).

Etudes *in vitro* sur du tissu cérébral

Des rats adultes (300g) Sprague-Dawley ont été nourris à volonté en accord avec les règles éthiques des National Institutes of Health.

Pour préparer des coupes de cerveau, six rats ont été sacrifiés par intoxication de CO₂ et leurs cerveaux ont été immédiatement retirés et placés sur la glace sèche. Les cerveaux congelés ont été coupés en sections transversales de 20 µm d'épaisseur au moyen d'un cryostat à -40°C. Ces sections, ensuite posées sur des lames, ont été séchées à l'air puis congelées à -70°C jusqu'au jour de l'étude, au maximum 7 jours plus tard.

Etudes de liaison à l'équilibre

Le jour de l'étude, les lames ont été décongelées à température ambiante, puis pré-incubées pendant 20 min à température ambiante (environ 23°C) dans une solution tampon de dosage (HEPES + TRIS pH = 7,5). L'incubation suivante (l'incubation principale) a duré 60 min et a été exécutée à la fois à température ambiante et sur glace (environ 4°C). Lors de cette incubation principale, les lames ont été exposées à [¹⁸F]FP-TZTP (1-2 nM) et à des concentrations de FP-TZTP non radioactif allant de 10⁻¹² à 10⁻⁷ M. La liaison non spécifique a été déterminée avec une concentration de 10⁻⁵ M de FP-TZTP. A la fin de l'incubation principale, les lames ont été rincées deux fois dans une solution tampon de dosage glacée pendant 2 min. Une fois séchées à l'air, les lames ont été placées dans une cassette pour imagerie à phosphorescence Fuji pendant environ 24 h, puis lues avec un Fujifilm BAS-5000 (FUJIFILM Medical Systems USA, Inc.). Des régions d'intérêt ont été dessinées à la main au niveau de l'hippocampe, du cortex, du cervelet, du striatum,

du colliculus inférieur et supérieur et du thalamus en utilisant le logiciel Science Lab 2001, version 4.0. La fixation de la radioactivité, exprimée en photoluminescence stimulée par mm carré (psl/mm²), a été comparée entre les différentes régions à température ambiante et sur glace.

Etudes cinétiques de dissociation

Les études cinétiques de dissociation de liaison du [¹⁸F]FP-TZTP ont été effectuées aux temps t suivants (t = 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 et 45 min). Dans ces expériences, la procédure a été la même que celle décrite ci-dessus pour les études de liaison à l'équilibre. Les tranches ont été retirées par groupe à différents moments, selon le protocole, séchées à l'air, placées dans une cassette pour imagerie à phosphorescence et lues avec un Fujifilm BAS-5000 après environ 24 heures d'exposition. Des régions d'intérêt ont été dessinées à la main au niveau de l'hippocampe, du cortex, du cervelet, du striatum, du colliculus inférieur et supérieur et du thalamus en utilisant le logiciel Science Lab 2001, version 4.0. La fixation de la radioactivité, exprimée en psl/mm², a été utilisée pour définir les cinétiques de dissociation par région (k_{off}) et les interceptions en utilisant le programme statistique Graphpad InStat (GraphPad Software, Inc, San Diego CA).

1.3 Résultats

Etudes cellulaires

Etudes de liaison à l'équilibre

Dans les études de liaison à l'équilibre, réalisées sur des cellules CHO M1-M5 (les clones transfectés avec les cinq sous-types de récepteurs muscariniques humains) avec le radiotracteur [¹⁸F]FP-TZTP, les résultats de l'incubation soit à 4°C ou 37°C étaient similaires et reflétaient le pourcentage élevé de radioactivité liée spécifiquement à l'intérieur de la cellule (Tab. 1). Par nos tests, nous avons été en mesure soit de mesurer ou de calculer la liaison totale, la liaison spécifique interne et externe, et la liaison totale non spécifique. Pour les cinq sous-types de M1 à M5, la liaison spécifique était de 85%,

86%, 86%, 82% et 86%, respectivement. La radioactivité interne des sous-types de M1 à M5 représentait la majorité de la radioactivité liée spécifiquement, soit le 75%, 78%, 81%, 81% et 72%, respectivement. Les valeurs de la liaison spécifique totale et la liaison spécifique interne sous forme de pourcentage de la liaison totale ne diffèrent pas de façon statistiquement significative (test *t* de Student) entre les cinq sous-types, ou en fonction de la température.

Table 1. [¹⁸F]FP-TZTP specific binding internal (SB_i), specific binding external (SB_e), and non-specific binding (NSB) as a percentage of total binding per million M₁, M₂, M₃, M₄, or M₅-CHO cells.

Liaison spécifique interne (SB_i), externe (SB_e) et non spécifique (NSB) de [¹⁸F]FP-TZTP exprimée en pourcentage de liaison totale par million de cellules CHO exprimant M₁, M₂, M₃, M₄ et M₅.

CHO type	37°C for 30 min (n=5)			4°C for 120 min (n=3)		
	SB _i	SB _e	NSB	SB _i	SB _e	NSB
	of FP-TZTP as % of total binding			of FP-TZTP as % of total binding		
M ₁	64±12	21±10	15±7	80±14	13±6	7±3
M ₂	66±14	19±11	15±5	93±8	1±5	6±2
M ₃	70±18	16±6	14±6	62±11	25±6	13±5
M ₄	66±12	16±7	14±5	70±8	24±5	6±3
M ₅	61±15	24±10	15±6	86±12	8±5	6±3

Data are expressed as % mean±SD.

Etudes de saturation par compétition

Afin d'examiner la liaison potentielle de FP-TZTP aux récepteurs sigma, nous avons effectué des essais de saturation sur CHO-M2 et le type sauvage (WT) en utilisant [¹⁸F]FP-TZTP (1-2 nM) et de [³H](+) pentazocine (2-3 nM) avec les deux composés non radiomarqués (10⁻⁴ M). En utilisant Prism 4.0, nous avons été en mesure de calculer B_{max}, K_i, et CI₅₀ (Tab. 2). Nos résultats montrent qu'il n'y avait pas de différence en ce qui concerne K_i ou CI₅₀ entre les cellules CHO-WT et les cellules CHO-M2 pour aucune des quatre combinaisons de radioligand et ligand non-radioactif. Seul le B_{max} pour FP-TZTP avec les cellules CHO-WT est 10% plus petit que celui avec les cellules CHO-M2. L'affinité de FP-TZTP pour les récepteurs M2 est environ 100 fois plus élevée que pour les récepteurs sigma dans les cellules soit CHO-M2 ou CHO-WT.

Table 2. B_{max} , K_i , and IC_{50} of [^{18}F]FP-TZTP and [3H](+)pentazocine using M₂-CHO and WT-CHO cells. **B_{max} , K_i , et IC_{50} de [^{18}F]FP-TZTP et de [3H](+)pentazocine en utilisant des cellules CHO-M₂ et CHO-WT.**

Ligand	K_i (nM): range	B_{max} (fmol): mean \pm SD	IC_{50} (nM): range
[^{18}F]FT-TZTP vs FP-TZTP (n=3)	^a 0.667-1.43	53.83 \pm 0.326	1.33-2.86
	^b 0.295-0.828	47.44 \pm 0.194	0.589-1.66
[^{18}F]FT-TZTP vs (+)pentazocine (n=2)	^a 26.9-44.6	52.25 \pm 0.158	53.9-89.2
	^b 9.77-18.1	48.36 \pm 0.242	19.5-36.1
[3H](+)pentazocine vs (+)pentazocine (n=3)	^a 0.553-1.007	113.0 \pm 4.06	1.66-3.02
	^b 0.222-0.381	94.84 \pm 0.621	0.665-1.14
[3H](+)pentazocine vs FP-TZTP (n=3)	^a 86.2-179	104.0 \pm 1.21	258-536

^aM₂-CHO, ^bWT-CHO.

Les études in vitro sur du tissu cérébral

Etudes de liaison à l'équilibre

De façon similaire aux résultats obtenus en utilisant les cellules CHO, les études de liaison à l'équilibre réalisées sur le tissu cérébral de rat en utilisant la technique d'autoradiographie, ne montrent aucune différence significative (en utilisant le test *t* de Student) dans la fixation du [^{18}F]FP-TZTP parmi les régions suivantes: l'hippocampe, le cortex, le cervelet, le striatum, colliculus supérieur et inférieur, et le thalamus. La fixation de radioactivité était toujours inférieure lorsque les études étaient réalisées sur la glace par rapport à celles effectuées à température ambiante, mais la diminution de l'absorption de la radioactivité par rapport à la concentration accrue du FP-TZTP non radiomarqué, indiquant une liaison saturable, était similaire aux deux températures (Fig. 10).

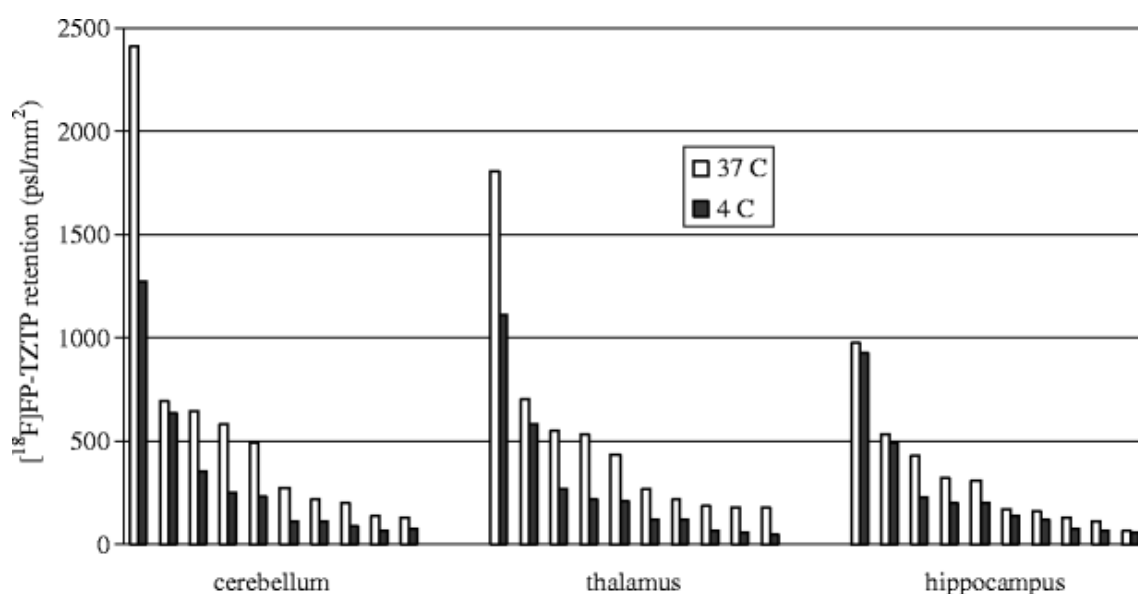


Figure 10. [¹⁸F]FP-TZTP uptake in rat brain tissue slices.

These were incubated for 1 h at room temperature and on ice (about 4°C) with concentrations of FP-TZTP ranging from 10⁻¹² to 10⁻⁹ M (n=3).

Distribution de [¹⁸F]FP-TZTP au niveau cérébral chez le rat.

Les coupes cérébrales ont été incubées pendant une heure à 37°C et 4°C avec des concentrations de FP-TZTP allant de 10⁻¹² à 10⁻⁹ M (n=3).

La dissociation des études cinétiques

Les cinétiques de dissociation de [¹⁸F]FP-TZTP au niveau de l'hippocampe, du cortex, du cervelet, du striatum, du colliculus inférieur et supérieur, et du thalamus ont été mieux analysés (*best fit*) par une fonction mono-exponentielle. Les coefficients de dissociation des régions avec un pourcentage plus élevé de M1, M3, M4 étaient statistiquement différents des régions avec un pourcentage plus élevé de M2 (Tab. 3). La proportion de sous-type M2 dans les différents tissus (Li, Yasuda et al. 1991; Levey 1993; Gitler, Boulay et al. 1995; Cohen, Zeeberg et al. 1998) est également indiqué dans le tableau 3.

Table 3. [¹⁸F]FP-TZTP off-rates determined *in vitro* from rat brain slices in 3 independent studies.

Constantes de dissociation de [¹⁸F]FP-TZTP déterminées *in vitro* à partir de 3 études séparées sur coupes cérébrales de rat.

Brain regions	Off-rates (min ⁻¹): mean±SD (n=3)	M ₂ receptors (% of total muscarinic receptors) ^a
Striatum	0.04577±0.0025	13%
Hippocampus	0.04357±0.0003	18%
Cortex	0.04283±0.0007	22%
Inferior colliculus	0.03983±0.0001	40%
Superior colliculus	0.03870±0.0013	46%
Thalamus	0.03833±0.0015	50%
Cerebellum	0.03493±0.0011	89%

^aData retrieved from previous studies (Li, Yasuda et al. 1991; Levey 1993; Gitler, Boulay et al. 1995; Cohen, Zeeberg et al. 1998).

L'utilisation des statistiques ANOVA sur échantillons appariés sur les coefficients de dissociation a permis de séparer les régions cérébrales en trois groupes différents: (i) le striatum, l'hippocampe et le cortex, (2i) le colliculus inférieur, le colliculus supérieur, et le thalamus, et (3i) le cervelet. À une exception près (cortex vs. le colliculus inférieur), tous les tissus du groupe i ont montré des différences statistiques significatives au niveau des coefficients de dissociation par rapport à tous les tissus du groupe 2i et du groupe 3i ($p < 0,05$), mais aucune différence statistique n'a été observée entre les tissus au sein de groupe i. La seule exception était le cortex vs. le colliculus inférieur. Les coefficients de dissociation des régions du groupe 2i différaient significativement de celui du cervelet (groupe 3i), mais il n'y avait pas de différences au sein du groupe. Le coefficient de dissociation du cervelet différait statistiquement sur un t-test apparié de ceux du groupe 2i ($p < 0,03$) et du groupe i ($p < 0,07$). Puisque le critère sélectionné pour séparer ces tissus était leur densité en récepteurs M₂, nous avons montré que la cinétique de dissociation est corrélée avec le pourcentage de récepteurs M₂ (Fig. 11). Nous avons également constaté que les interceptions à partir des équations exponentielles corrélaient bien ($R_2 = 0,99$) avec la concentration totale des récepteurs dans chaque tissu (Fig. 12).

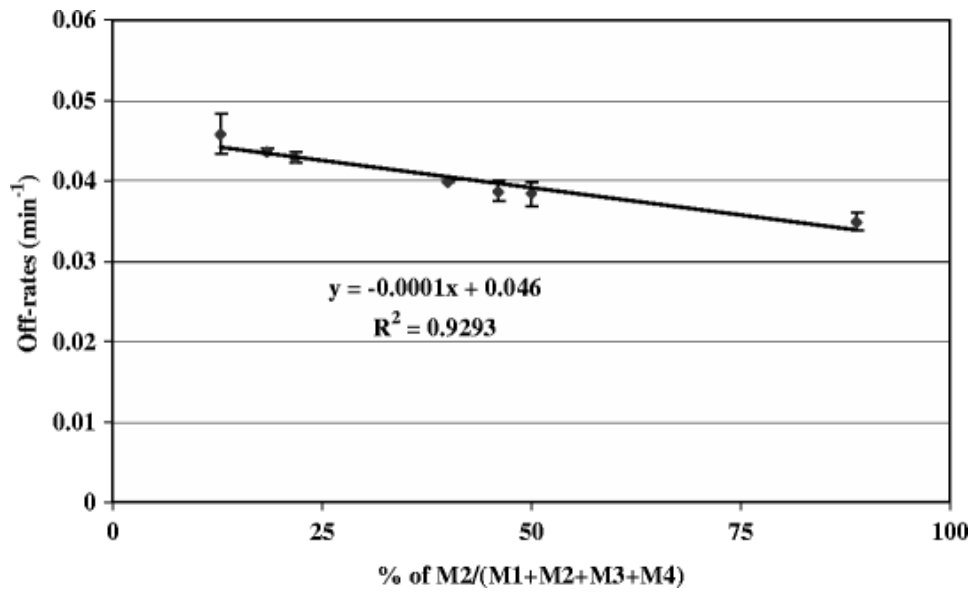


Figure 11. Correlation of off-rates with percentage of M₂ receptors per brain region.

Corrélation des constantes de dissociation avec le pourcentage de M₂ au niveau des régions cérébrales.

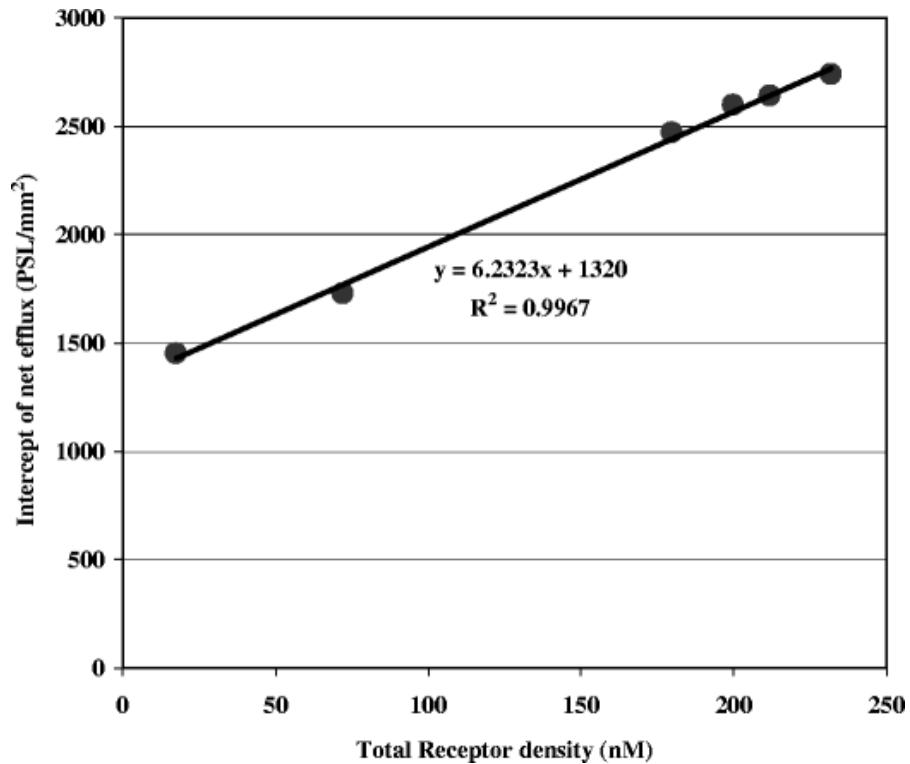


Figure 12. Correlation of intercept from dissociation kinetic studies in rat brain with total muscarinic receptor concentration.

Corrélation entre cinétique de dissociation et concentration totale des récepteurs muscariniques au niveau cérébral chez le rat.

1.4 Discussion

1.4.1 Etudes cellulaires *in vitro*

Etudes de liaison à l'équilibre

Dans une tentative de comprendre *in vitro*, les mécanismes responsables de la sélectivité *in vivo* de FP-TZTP pour M2, démontré chez les souris knock-out (Jagoda, Kieseewetter et al. 2003), nous avons mesuré dans les cellules CHO les affinités à l'équilibre pour chaque sous-type de récepteur muscarinique et examiné l'internalisation comme une raison possible de la sélectivité.

L'affinité de FP-TZTP pour les différents sous-types de récepteurs muscariniques n'était pas significativement différente de celle pour le P-TZTP (affinité de 23 nM pour M1; 1,5 nM pour M2 (Kieseewetter, Lee et al. 1995)). La nette préférence pour la liaison M2 *in vivo*, en particulier chez les souris KO (Jagoda, Kieseewetter et al. 2003), n'était pas prévisible à partir des données *in vitro*. Gitler et al. (Gitler, Boulay et al. 1995) ont rapporté la même imprévisibilité avec le QNB, en déclarant «Etrangement, la sélectivité *in vivo* pour M2 n'est pas corrélée avec la sélectivité pour M2 *in vitro*». Puisque les constantes d'affinité *in vitro* n'ont pas expliqué la sélectivité, nous avons réalisé des expériences pour déterminer si l'internalisation ou une fixation préférentielle étaient impliquées. L'internalisation des récepteurs muscariniques a fait l'objet de nombreuses études (Bunemann and Hosey 1999; van Koppen and Kaiser 2003). En bref, les récepteurs qui reçoivent un stimulus d'une intensité suffisante ou pour une durée suffisante peuvent changer de conformation de sorte à ce que les récepteurs soient (1) temporairement insensibles à la stimulation au niveau synaptique ou (2) temporairement non exposés vers l'espace extracellulaire puisqu'ils sont internalisés dans des vésicules cytoplasmiques. Les deux étapes sont réversibles et les récepteurs peuvent être réexposés sur le côté externe de la membrane cellulaire pour être fonctionnels. Toutefois, si le stimulus est trop long ou trop intense, le récepteur sera métabolisé et la néo synthèse de nouvelles protéines sera nécessaire pour le remplacer. Tous ces changements sont

dépendants de l'ATP et se produisent seulement à la température du corps. L'internalisation a souvent été retenue comme l'explication des tests dans lesquels le radioligand n'est pas sensible à la concurrence d'un neurotransmetteur (Laruelle 2000). Toutefois, nous avons constaté que > 72% de la liaison spécifique dans des cellules CHO a été intracellulaire à 37°C mais également à 4°C. Par conséquent, la diffusion passive est un facteur important pour ce radioligand lipophile. Cela n'est pas surprenant étant donné que [¹⁸F]FP-TZTP est hautement extrait à travers la BHE (Shimoji, Esaki et al. 2003) et, par conséquent, peut facilement traverser les membranes cellulaires. Le NSB est habituellement mesuré par la radioactivité captée par les cellules incubées avec le radioligand et une dose de blocage d'un composé qui va sur les mêmes récepteurs que le radioligand. Dans ce cas, il n'y a pas d'agonistes des récepteurs muscariniques M2 sélectifs capables de traverser la membrane cellulaire et, par conséquent nous n'avons pas pu utiliser la méthode traditionnelle pharmacologique pour calculer le NSB. Par l'utilisation du FP-TZTP à 10⁻⁴ M, nous avons pu mesurer le NSB, qui était de 15% de la TB à son plus haut, c'est à dire, une valeur raisonnable.

Nous en avons également déduit que la densité des récepteurs est supérieure à celle obtenue en utilisant des préparations de membranes, car la majorité de la liaison spécifique a été intracellulaire.

Etudes de liaison par saturation

Puisque le [¹⁸F]FP-TZTP se lie également aux récepteurs σ 1 (Kiesewetter, Lee et al. 1995) avec une affinité relativement élevée (36,9 nM selon le dosage Robert Mach, communication personnelle), nous avons mené les études de compétition de FP-TZTP et la (+) pentazocine. Dans nos études de liaison par saturation sur des cellules M2-CHO et WT-CHO, B_{max} pour FP-TZTP pour les cellules WT-CHO était d'environ 10% plus petit que B_{max} pour les M2-CHO. Ce résultat est en accord avec la présence de deux types de récepteurs que les cellules CHO expriment naturellement les deux types de récepteurs sigma et muscariniques (Mei and Pasternak 2001). Le K_i est environ 1 nM pour les deux types de cellules lorsque [¹⁸F]FP-TZTP et [³H] (+) pentazocine sont inhibés par les

composés homologues non radiomarqués. Lorsque les composés ont été utilisés de façon croisée, K_i était d'environ 20 nM quand la (+) pentazocine était en compétition avec [^{18}F]FP-TZTP et autour de 100 nM quand FP-TZTP était en compétition avec [^3H] (+) pentazocine. La différence avec les valeurs précédemment signalées de K_i pour la liaison de FP-TZTP au récepteur sigma pourrait être due à des conditions d'essai différentes et le fait que ces tests ont été effectués sur des cellules intactes, par opposition à des préparations de membranes. Les valeurs IC_{50} de FP-TZTP vs. [^{18}F]FP-TZTP et la (+) pentazocine vs. [^3H] (+) pentazocine étaient de un à deux ordres de grandeur plus faible (i.e., une plus grande affinité) que ceux obtenus en compétition FP-TZTP contre [^3H] (+) pentazocine ou de la pentazocine contre le [^{18}F]FP-TZTP. Ceci suggère que: (1) les deux composés se lient à deux sites différents et (2) en condition d'injection de "dose traceur" (minime), le [^{18}F]FP-TZTP se lie aux récepteurs M2 de façon préférentielle. Certaines études ont émis l'hypothèse que les récepteurs sigma auraient un rôle de modulateur dans la libération de l'acétylcholine (Matsuno, Senda et al. 1995; Bowen 2000). Ce serait d'une grande importance si les études étaient réalisées *in vivo* ou *ex vivo*, avec une injection d'un ligand du récepteur sigma au préalable.

1.4.2 Etudes *in vitro* sur le tissu cérébral

Etudes de liaison à l'équilibre

Puisque les données des études cellulaires *in vitro* n'ont pas révélé de raison pour la liaison sélective du FP-TZTP pour le récepteur M2, nous nous sommes dirigés vers un modèle plus réaliste tel que le cerveau de rat. Malheureusement, la distribution bien caractérisée des récepteurs muscariniques dans le cerveau du rat (Li, Yasuda et al. 1991; Levey 1993; Gitler, Boulay et al. 1995; Cohen, Zeeberg et al. 1998) montre qu'il n'y a pas de région de référence (i.e., région sans récepteurs M2), ou bien une région qui ne contient qu'un seul sous type de récepteur (à l'exception du cervelet, où l'expression de M2 est prédominante). La fixation de radioactivité plus importante observée à 37°C par rapport à 4°C a augmenté, non seulement dans les tissus riches en M2, mais dans chacun d'eux, indépendamment de la distribution des différents sous-types. En conclusion, les

études de liaison à l'équilibre sur coupes cérébrales n'ont pas élucidé la cause de la spécificité M2.

Etudes cinétiques de dissociation

Nous avons ensuite étudié les cinétiques de dissociation de [¹⁸F]FP-TZTP à partir de coupes cérébrales de rat pour 7 régions cérébrales pour lesquelles la densité de récepteurs muscariniques est connue (Gitler, Boulay et al. 1995; Cohen, Zeeberg et al. 1998). Nous avons suivi la procédure de Gibson et al. (Gibson, Moody et al. 1992), qui a observé deux composantes dans le taux de clairance de [¹²⁵I] IQNB lors des études *in vitro*. L'ordre de grandeur des coefficients de dissociations pour [¹⁸F]FP-TZTP (0.035 à 0.046 min⁻¹) est semblable à la composante rapide trouvée pour IQNB par Gibson et al.

Dans nos études, nous avons trouvé une dépendance similaire sur le type de tissu, bien que dans le cas de [¹⁸F]FP-TZTP, les tissus avec un pourcentage plus élevé de récepteurs M2 avaient une cinétique de dissociation plus lente. La séparation en deux composantes n'a pas été possible parce que nous n'avions pas assez de points pour définir une courbe à deux composantes, puisque la composante lente était déjà rapide. Toutefois, la moyenne pondérée des deux composantes a conduit à une cinétique de dissociation globale plus lente pour [¹⁸F]FP-TZTP au niveau du récepteur M2. En effet, le cervelet, où le sous-type M2 représente 90% des récepteurs muscariniques, avait le plus lent coefficient de dissociation ($0,03493 \pm 0,001106$), tandis que le striatum (avec 13% des récepteurs M2) était associé au coefficient de dissociation plus rapide ($0,04577 \pm 0,00250$). Il est intéressant de préciser que seule la cinétique de dissociation entre les sous-types est différente. Le graphique de la figure 12 montre que le point d'intersection est en relation à la densité totale des récepteurs, ce qui suggère que [¹⁸F]FP-TZTP se lie à tous les sous-types de récepteurs muscariniques. Bien que ces coefficients de dissociation soient statistiquement différents, l'ampleur des constantes n'est pas de nature à correspondre à la pharmacocinétique *in vivo*. Puisque FP-TZTP semble se lier à tous les sous-types dans un premier temps, une procédure d'échantillonnage beaucoup plus rapide serait nécessaire si l'on voulait séparer en deux les composantes de la cinétique de dissociation. Toutefois, la tendance vers une plus lente cinétique de dissociation pour les tissus

contenant un pourcentage plus élevé de récepteurs M2 indique que même la moyenne pondérée des deux composantes reflète le ralentissement de dissociation du [¹⁸F]FP-TZTP à partir du récepteur M2. Cette étude fournit une preuve supplémentaire que ce radiopharmaceutique évalue la disponibilité des récepteurs M2 en vertu de la cinétique de dissociation sélective et souligne sa sensibilité à l'acétylcholine endogène.

Cette étude montre également que les constantes d'affinité à l'équilibre obtenues *in vitro* ne sont pas toujours concluantes et suffisantes pour caractériser la pharmacocinétique d'un composé *in vivo*. Sur la base de notre expérience avec [¹⁸F]FP-TZTP, la mesure des deux constantes d'affinité à l'équilibre et de cinétique de dissociation semble être la procédure de choix *in vitro* pour détecter des différences, petites mais significatives, entre les liaisons aux sous-types de récepteurs.

Dans ce cas, la sélectivité de [¹⁸F]FP-TZTP pour M2 repose sur une différence de coefficient de dissociation.

1.5 Conclusion de l'étude

La cinétique de dissociation du FP-TZTP de M2 plus lente par rapport aux quatre autres sous-types de récepteurs muscariniques est un facteur de sélectivité.

2 Validation de l'ATLAS avec le fluorodésoxyglucose marqué au F-18

2.1 Etude du métabolisme cérébral du rat sous anesthésie

Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with 18F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling (§ annexe 2)

2.1.1 Introduction

Depuis presque 30 ans, la TEP est utilisée en cardiologie, en l'oncologie et en neurologie chez l'homme. Cependant, la résolution spatiale des TEP typiques utilisées chez l'homme les rend impropres pour les études cérébrales chez les petits animaux. D'autre part, les méthodes quantitatives autoradiographiques chez les petits animaux ont une excellente résolution spatiale, mais elles nécessitent le sacrifice de l'animal. Plusieurs modèles de rongeurs et de souris génétiquement modifiées ont été développés pour étudier des maladies humaines. Leur coût, leur disponibilité souvent limitée, et le souhait de les utiliser dans des études longitudinales ont poussé le développement de méthodes d'imagerie quantitative avec une meilleure résolution adaptée pour des études répétées chez le petit animal. La possibilité d'imager la biodistribution complète chez un animal plutôt qu'en sacrifier plusieurs pour chaque temps t , non seulement réduit le nombre d'animaux, mais augmente également la précision statistique en rendant possible les comparaisons statistiques d'échantillons appariés. Des TEP pour petits animaux ont été développés (Green, Seidel et al. 2001), mais la sensibilité de détection en maximisant la résolution spatiale ainsi que la résolution et l'uniformité demeurent un défi.

Les méthodes quantitatives en TEP exigent non seulement une mesure précise de la radioactivité au niveau des tissus, mais aussi une mesure de la quantité de radiotracer délivrée au tissu pendant l'intervalle d'étude, soit la "fonction d'entrée." Ceci représente un deuxième défi de l'imagerie TEP des animaux de petite taille. L'échantillonnage du sang artériel permet la mesure la plus directe et appropriée de la fonction d'entrée, bien

que d'autres mesures moins directes aient été proposées (Kallinowski, Brownell et al. 1991; Hawkins, Choi et al. 1993; Green, Gambhir et al. 1998; Lapointe, Brasseur et al. 1999). Une approche alternative, souvent utilisée, est celle d'inférer la fonction d'entrée par des mesures au niveau d'un tissu de référence. La détermination précise de l'activité dans le tissu de référence peut être plus difficile chez les petits animaux en raison des effets de volume partiel.

Pour répondre au défi de développer des TEP pour petits animaux avec une sensibilité élevée et une haute résolution, le Laboratoire de Physique du service d'imagerie en médecine nucléaire du Clinical Center, National Institutes of Health, a construit le Advanced Technology Laboratory Animal Scanner (ATLAS) (Seidel, Vaquero et al. 2003). Dans la présente étude, nous avons exploré la possibilité d'utiliser l'ATLAS pour les études quantitatives chez des rats anesthésiés sous acquisition dynamique et par échantillonnage du sang artériel. Pour l'étude de faisabilité, nous avons choisi le radiotracteur [¹⁸F]FDG, afin de déterminer des taux régionaux de la consommation de glucose au niveau cérébral. Les mesures d'activités tissulaires déterminées avec l'ATLAS ont été validées par comparaison avec celles obtenues par comptage direct des échantillons de tissus disséqués immédiatement après l'acquisition des images TEP. La consommation régionale du glucose cérébral (rCMRglu) a été déterminée à partir du plasma artériel et des courbes d'activité au cours du temps au niveau du tissu cérébral selon la méthode d'analyse graphique de Patlak et al. (Patlak, Blasberg et al. 1983; Patlak and Blasberg 1985). De plus, nous avons effectué une analyse *post mortem* statique d'un animal sous anesthésie et un autre animal éveillé, après 45 min de distribution de [¹⁸F]FDG, afin d'illustrer l'effet de l'isoflurane sur la fixation du traceur.

2.1.2 Matériels et méthodes

Produits chimiques

L'halothane et l'isoflurane (Forane) ont été achetés chez Baxter et la solution pour l'euthanasie (Beuthanasia-D) chez Schering-Plough. Le [¹⁸F]FDG a été synthétisé selon la routine de notre établissement.

Caractéristiques de l'ATLAS

L'ATLAS a un anneau de 11,8 cm de diamètre, avec 8 cm d'ouverture, un champ de vu de 6 cm en transversal et de 2 cm en axial. La résolution spatiale de ce système est de 1,8 mm de largeur à mi-hauteur (FWHM) en rétroprojection filtrée et de 1,5 mm en OSEM 3D (Green, Seidel et al. 2001). La sensibilité est de 1,8% en utilisant une fenêtre de 250 à 650 keV et 2,7% avec une fenêtre de 100 à 650 keV (Seidel, Vaquero et al. 2003).

Pour l'étalonnage d'activité scanner, un cylindre de 3,1 cm de diamètre par 7,5 cm de long a été utilisé pour simuler la tête de rat et son torse. Ce cylindre, rempli de ¹⁸F dans l'eau, est centré dans l'anneau du scanner et imagé. La radioactivité dans le cylindre a été déterminée par un calibre de dose, et cette valeur a été divisée par le volume du cylindre pour donner la concentration. A partir de ces données, un facteur d'étalonnage (C) a été déterminé afin de relier les coups relevés en image à la concentration du traceur dans l'animal selon l'équation:

$$C = \frac{(\text{phantom kBq/mL } [\mu\text{Ci/mL}])}{(\text{cps in a voxel/voxel volume in image})}$$

Ainsi, pour toute nouvelle image, la concentration peut alors être calculée en multipliant les coups par seconde (cps) dans un voxel donné de cette image par le facteur d'étalonnage C. Ce facteur de calibration a été déterminé périodiquement et ne varie pas significativement avec le temps.

Préparation des animaux

Des rats adultes mâles Sprague-Dawley (220-268 g) ont été achetés auprès de Charles River Laboratories et maintenus dans une pièce à température contrôlée avec nourriture et eau *ad libitum*. Ils ont été privés de nourriture, mais pouvaient librement accéder à l'eau durant les 16 h précédentes la préparation chirurgicale pour les expériences. Toutes les procédures ont été approuvées par le Centre de soins des animaux et du Comité clinique. Les animaux ont été anesthésiés à l'halothane (5% à induction puis 1,5% mélangé avec 30% O₂/70% N₂O). Des cathéters en polyéthylène (PE 50; Clay Adams) ont été insérés dans les artères fémorales gauche et à droite et dans la veine fémorale gauche. Un cathéter artériel a été utilisé pour surveiller la tension artérielle moyenne (MABP) et l'autre a été utilisé pour l'échantillonnage de sang artériel. La longueur du cathéter utilisé pour le prélèvement sanguin a été fixée précisément à 16 cm afin de minimiser les erreurs d'échantillonnage. Le cathéter veineux a été utilisé pour l'injection du [¹⁸F]FDG. Les cathéters ont été placés sous la peau pour permettre à l'animal de se déplacer librement sans endommager les cathéters.

Variables physiologiques

La tension artérielle était surveillée en continu avec un analyseur de tension (modèle 300; Micro-Med). CO₂, O₂ et pH ont été mesurés avec un analyseur de gaz du sang (modèle 288 Système de gaz de sang; Ciba-Corning Diagnostics Corp.) L'hématocrite a été déterminé dans des échantillons de sang artériel centrifugé dans une Microfuge (Beckman Instruments). La concentration artérielle de glucose plasmatique a été déterminée avec un analyseur de glucose Beckman 2 (Beckman Instruments).

Études TEP

Les acquisitions TEP ont été réalisées chez 9 rats anesthésiés avec l'isoflurane (5% pour l'induction puis 2% mélangé avec 100% d'O₂). Environ 500 µL contenant [¹⁸F]FDG (49,9 ± 10,5 MBq [1,348 ± 0,284 mCi] 300-700 µL en volume) ont été administré *via* le cathéter veineux sur une période d'environ 15 secondes. L'acquisition dynamique, lancée

à l'injection du radiotracer, a durée 60 min (en séquence de 120 images de 30 s). A la fin du scan, le rat a été euthanasié par injection veineuse en bolus.

Pour obtenir une image de haute qualité et visualiser les effets de l'anesthésie à l'isoflurane 2% sur l'absorption du [^{18}F]FDG, nous avons acquis pendant 60 min une image statique cérébrale *ex vivo* sur un rat qui était éveillé pendant les 45 min d'absorption du traceur et sur un autre rat qui était sous anesthésie. L'activité de [^{18}F]FDG injectée était de 63 MBq (1.7mCi).

Echantillonnage du sang artériel

Pour déterminer les courbes d'activité plasmatique, le protocole d'échantillonnage du sang de l'autoradiographie quantitative selon la méthode de 2-désoxy-D- ^{14}C -glucose (2- ^{14}C -DG) (Sokoloff, Reivich, et al. 1977) a été suivi. Celui-ci prévoit le prélèvement de six échantillons en continue sur ~ 15 s et 13 échantillons supplémentaires à $t=0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 15, 25, 35, 45, 60$ min. Des échantillons de sang, environ 100 μL en volume, ont été retirés dans des microtubes polyéthylène recouvert d'héparine-lithium-fluorure (Beckman Instruments, Inc), le plasma a été séparé des globules rouges par centrifugation, et 40 μL de plasma ont été comptés dans un γ -counter (modèle Assistant 1480; PerkinElmer Life Sciences Inc.) Le plasma restant a été utilisé pour mesurer la concentration de glucose.

Comptage direct des tissus

Immédiatement après le sacrifice du rat, le cerveau a été extrait et séparé en deux parties, chacune comprenant un hémisphère et la moitié du cervelet [CB] et du tronc cérébral [BS]. Une partie a été pesée et comptée; sa concentration de la radioactivité a été utilisée pour calculer la radioactivité du cerveau entier. L'autre part a été disséquée pour séparer le thalamus [TH], le cortex [CX], le CB et le BS. Ces structures ont été pesées et comptées dans un γ -counter. Toutes les activités ont été exprimées en MBq/mL, en supposant que la densité du tissu est égale à 1.

Analyse des données TEP

Les données du scanner ont été reconstruites par OSEM (Yao, Seidel et al. 2000). Les coups détectés par le scanner ont été convertis en MBq/mL par l'utilisation d'un facteur d'étalonnage (325,63 cps scanner/mL par MBq/mL) déterminé précédemment dans une étude de fantôme. En outre, une image contenant la somme de tous les coups collectés sur l'ensemble de l'intervalle de 60 min a été construite pour le placement des régions d'intérêt (ROI). Les ROIs ont été placées sur l'image sommée, en identifiant les coordonnées 3D de chaque structure dans un atlas du cerveau de rat (Kruger, Sapkota et al. 1995). Les courbes d'activité tissulaire ont été construites en soustrayant l'activité de fond de l'activité mesurée dans chaque structure.

Détermination de rCMRglu

La technique d'analyse graphique de Patlak et al. (Patlak, Blasberg et al. 1983; Patlak and Blasberg 1985) a été utilisée pour calculer rCMRglu. Cette technique nécessite que l'activité du plasma normalisé ($\theta(t) = \int_0^t C_p^*(t) dt / C_p^*(T)$, où $C_p^*(t)$ est la concentration plasmatique artérielle du [¹⁸F]FDG soit reportée en abscisse et l'activité du tissu normalisé ($C_i^*(T) / C_p^*(T)$, où $C_i^*(T)$ est l'activité des tissus) soit reportée en ordonnée. A l'équilibre, le graphique devient une ligne droite dont la pente K est égale à la constante de vitesse d'absorption nette du [¹⁸F]FDG dans le cerveau. Dans cette étude, les données acquises dans l'intervalle de 30-60 min ont été utilisées pour estimer K. rCMRglu a ensuite été calculée à partir de l'équation suivante: $rCMRglu = KC_p / LC$, où C_p est la concentration plasmatique de glucose artérielle et LC est la *Lumped Constant* de la méthode (Sokoloff, Reivich et al. 1977). Puisque la LC pour [¹⁸F]FDG n'a pas encore été déterminée par une méthode directe d'analyse chez le rat, nous avons utilisé la valeur de la LC pour le 2-[¹⁴C]-DG, c'est-à-dire 0,48 (Sokoloff, Reivich et al. 1977).

2.1.3 Résultats

Variabes physiologiques

Les résultats des variables physiologiques sont reportés dans le tableau 4.

Table 4. Physiological variables.

Variabes physiologiques.

Injection of ¹⁸ F-FDG	Physiologic Variables						
	MABP (mm Hg)	Body temperature (°C)	Hematocrit (%)	Plasma glucose concentration (mg/dL)	Blood gas analysis		
					pH	Pco ₂ (mm Hg)	PO ₂ (mm Hg)
Immediately before	89 ± 6	35.8 ± 1.1	44 ± 3	145 ± 23	7.30 ± 0.05	53 ± 6	368 ± 153
35 min after	86 ± 7	36.1 ± 1.2	41 ± 4*	165 ± 29 [†]	7.28 ± 0.04	55 ± 8	362 ± 144

**P* < 0.001 indicates statistically significantly different from baseline (Student *t* test).

[†]*P* < 0.01 indicates statistically significantly different from baseline (Student *t* test).

Values are mean ± SD (*n* = 4 for MABP; *n* = 9 for other parameters).

Images TEP

La figure 13 illustre la diminution généralisée dans rCMRglu chez l'animal anesthésié par isoflurane par rapport à l'animal qui était éveillé pendant la période de distribution de [¹⁸F]FDG. Ceci est cohérent avec une diminution de rCMRglu de 30-75%, selon les régions cérébrales, précédemment rapportée dans une étude chez des rats anesthésiés par rapport aux témoins éveillés (Maekawa, et al. 1986).

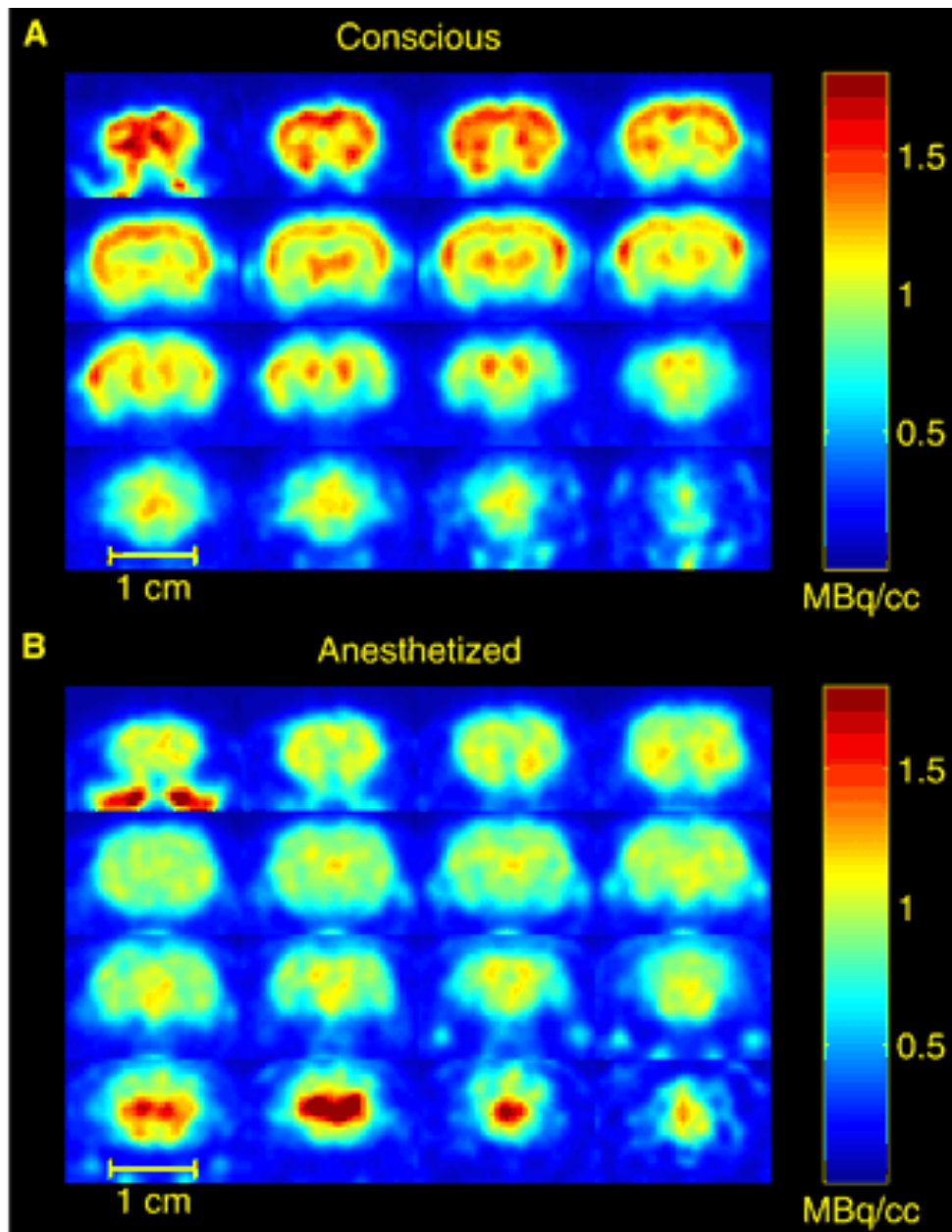


Figure 13. High-quality PET image of brain of rat that was awake (A) or under isoflurane anesthesia (B) during 45-min period of tracer uptake before scanning.

After tracer uptake, animals were killed and were placed on scanner bed, and heads were scanned for 60-min interval. Note high cortical uptake of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in the awake animal that is much reduced in the anesthetized rat. Compared with the awake animal, brain uptake of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ is much less heterogeneous in anesthetized rat. Slice thickness is 1.125 mm. Injected doses were 63.9 and 64.8 MBq (1.73 and 1.75 mCi) in the conscious and the anesthetized rats, respectively.

Images TEP-FDG chez le rat. La distribution cérébrale (45 minutes) s'est déroulée alors que le rat était en condition d'éveil (A) ou sous anesthésie (B).

N.B. : l'anesthésie réduit la distribution de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ au niveau cortical.

La figure 14 représente l'image sommée des 60 minutes d'acquisition d'un rat sous isoflurane.

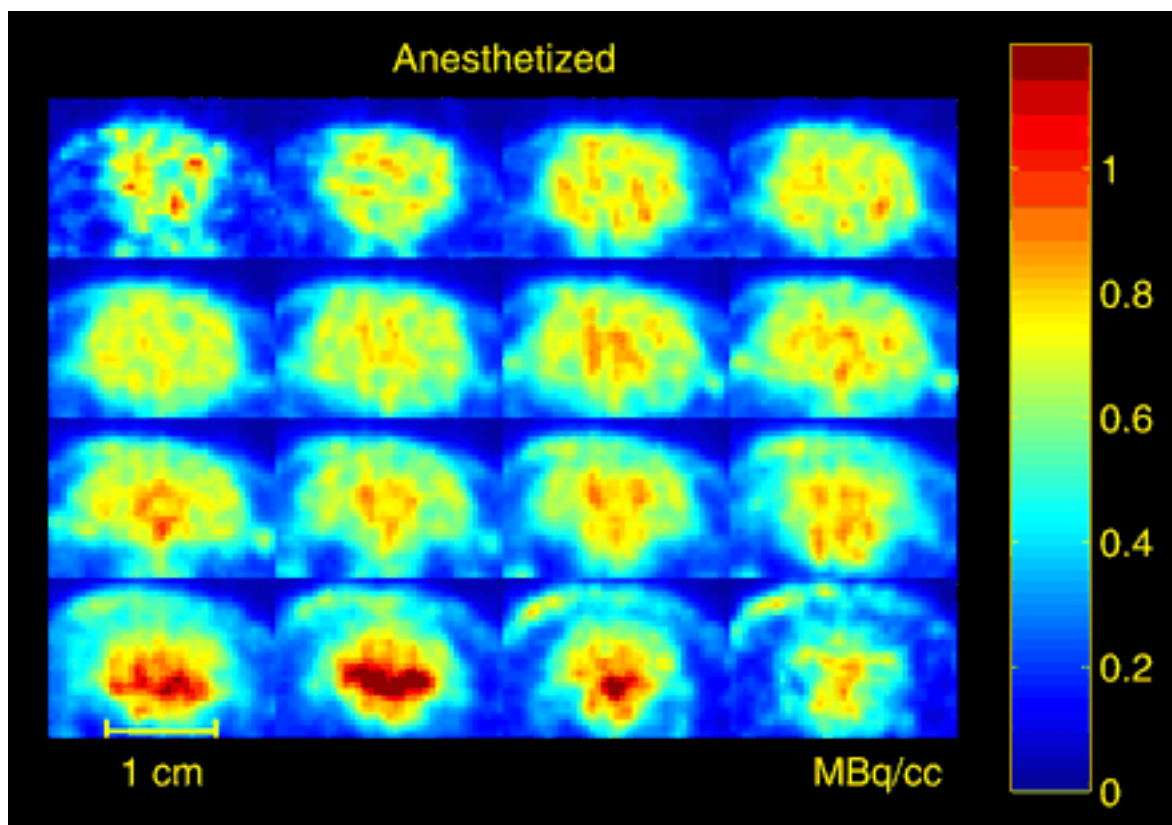


Figure 14. PET image of average activity during dynamic scanning of anesthetized rat from time of injection of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ until 60 min later.

Sections are sliced coronally; first slice is 4 mm caudal from tip of frontal lobe. Thickness of each slice is 1.125 mm. Note the low degree of regional differentiation due to effects of anesthesia; this necessitated use of an atlas of rat brain to identify structures by their spatial coordinates rather than through landmarks in PET image. The animal received 58 MBq (1.56 mCi) $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$.

Image TEP sommée d'une acquisition dynamique de 60 minutes chez un rat injecté avec $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ sous anesthésie.

Courbes d'activité au cours du temps

Des courbes d'activité au cours du temps dans un animal typique sont représentés dans la figure 15.

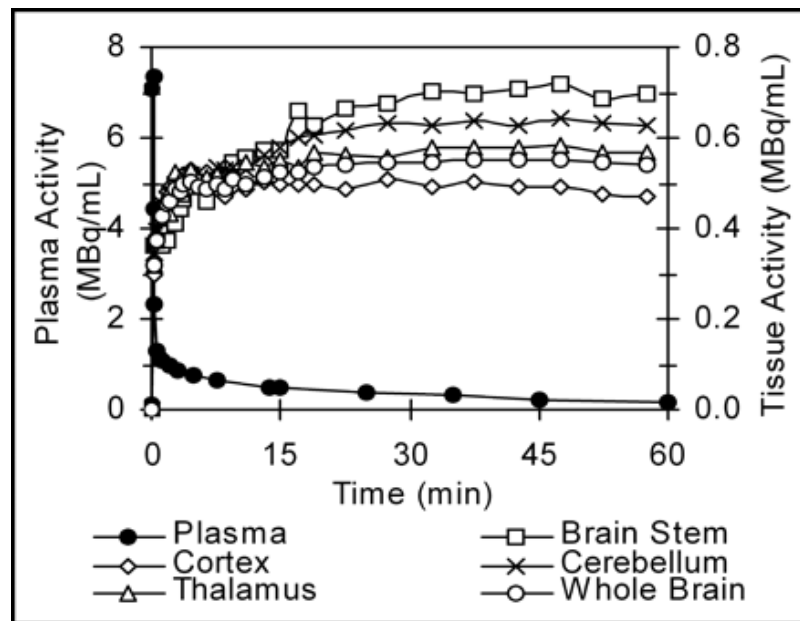


Figure 15. Time-activity curves of plasma (left ordinate) and whole brain, CX, TH, CB, and BS (right ordinate) from one animal.

Plasma [^{18}F]FDG peaks at ~ 0.2 min and then clears rapidly. Tissue activities initially rise rapidly and then progressively less rapidly until they are approximately constant between 30 and 60 min. Due principally to effects of anesthesia, measured tissue activities exhibit a fairly narrow range, approximately 1.5 fold.

Courbes d'activité au cours du temps du plasma (ordonnée de gauche) et de 5 régions cérébrales (ordonnée de droite) chez un rat.

L'ordonnée de gauche représente l'activité des tissus et l'ordonnée de droite représente l'activité du plasma. L'activité plasmatique a culminé à 0,17 min et ensuite est éliminée rapidement.

Au niveau des 5 structures cérébrales étudiées (cerveau entier, CX, TH, CB, et BS), l'activité a augmenté rapidement au début, puis le taux d'augmentation a ralenti progressivement jusqu'à atteindre un plateau entre 30 et 60 min.

Comparaison entre comptage direct des tissus et l'analyse par imagerie TEP

Les résultats de comptage direct des échantillons de tissus et de l'image TEP ont été convertis en MBq/mL et comparés (Tab. 5). Les valeurs obtenues à partir des images TEP

ont été réparties à l'activité des tissus directement comptés pour fournir une estimation du taux de recouvrement (image TEP de l'activité/activité du tissu). Le taux de récupération dans le cerveau entier était de $1,01 \pm 0,17$ ($r = 0,71$) (moyenne \pm SD et coefficient de corrélation, $n = 6$). En TH, CX, BS, et CB, les taux de récupération étaient de $0,99 \pm 0,04$ ($r = 0,99$), $0,90 \pm 0,19$ ($r = 0,73$), $1,01 \pm 0,24$ ($r = 0,43$) et $0,84 \pm 0,05$ ($r = 0,96$), respectivement (moyenne \pm SD, $n = 9$).

Table 5. Direct tissue counting vs. PET imaging data.

Données obtenues par comptage directe des tissus vs. l'imagerie TEP.

Comparison Between Direct Tissue Counting and Activity Obtained from PET Images							
Rat no.	Body weight (g)	Injected dose (MBq [mCi])	Recovery rate*				
			Whole brain	CX	TH	CB	BS
1	224	37.0 [1.000]	—	0.93	1.02	0.87	0.95
2	231	42.7 [1.153]	—	1.23	1.04	0.80	1.36
3	218	37.2 [1.006]	—	0.82	0.97	0.88	0.98
4	264	61.2 [1.655]	1.04	0.80	1.01	0.88	0.52
5	226	55.5 [1.501]	1.18	0.68	0.95	0.80	1.04
6	235	40.3 [1.090]	0.72	0.72	0.95	0.84	1.10
7	260	54.0 [1.460]	1.17	1.18	0.94	0.89	0.86
8	241	57.8 [1.563]	1.00	0.96	1.00	0.94	1.22
9	268	62.9 [1.700]	0.94	0.83	1.02	0.79	1.02
Mean \pm SD	241 \pm 18	49.9 \pm 10.5 [1.348 \pm 0.284]	1.01 \pm 0.17	0.90 \pm 0.19	0.99 \pm 0.04	0.84 \pm 0.05	1.01 \pm 0.24
Correlation coefficient between direct tissue counting and activity obtained from PET images			0.71	0.73	0.99	0.96	0.43

*Recovery rate was determined as (activity in MBq/mL in PET image acquired 55–60 min after injection of ^{18}F -FDG)/(activity in dissected tissue in MBq/mL).

Analyse de la consommation de glucose par la méthode de Patlak

L'analyse Patlak pour un rat est présentée dans la figure 16. Dans chaque graphique, la pente de la courbe est proportionnelle à $r\text{CMRglu}$. Les valeurs de $r\text{CMRglu}$ déterminées par analyse Patlak sur l'intervalle de 30-60 min après l'injection du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ était de $31,7 \pm 5,2$, $23,9 \pm 4,8$, $29,9 \pm 5,0$, $39,3 \pm 7,3$ et $28,1 \pm 4,6$ $\mu\text{mol}/100$ g/min (moyenne \pm écart type, $n = 9$) dans TH, CX, BS, CB, et le cerveau entier, respectivement.

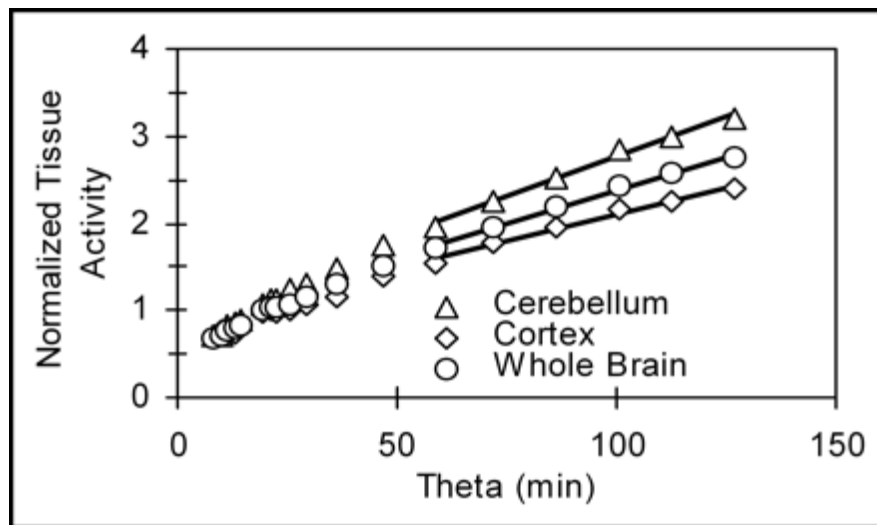


Figure 16. Patlak plot analysis of time-activity curves shown in Fig. 14 for CB, CX, and whole brain.

On abscissa is normalized plasma activity, $\theta(T) = \int_0^T C_p^*(t)dt/C_p^*(T)$, where $C_p^*(t)$ is the arterial plasma concentration of $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$. Tissue activity in each region divided by plasma activity is plotted on ordinate. After $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in tissue precursor pool(s) has equilibrated with $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in plasma, the graph is a straight line with slope K proportional to the rate of glucose utilization. Under anesthesia, glucose utilization is decreased and less heterogeneous than in an awake animal; hence, slopes of graphs for regions fall into a fairly narrow range.

Analyses de Patlak sur les courbes d'activité tissulaire cérébrale au cours du temps montrées en Fig. 14.

2.1.4 Discussion

Cette étude est le premier rapport d'une imagerie dynamique chez des rats anesthésiés avec un TEP pour petits animaux avec échantillonnage du sang artériel. L'étude a été conçue afin d'examiner la faisabilité de la réalisation des études quantitatives dynamiques en TEP chez les petits animaux.

Images TEP

L'imagerie TEP exige que l'animal soit immobilisé et actuellement la seule solution est l'anesthésie. Dans la présente étude, nous avons utilisé l'isoflurane, qui a des effets profonds sur la consommation de glucose. Pour illustrer les différences dans $r\text{CMRglu}$ entre l'animal éveillé et celui sous isoflurane, nous avons effectué un scan post-mortem de deux rats, l'un éveillé pendant la période de fixation du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ et l'autre sous anesthésie

à l'isoflurane. L'effet de l'immobilisation chez l'animal éveillé vis-à-vis de la biodistribution du [^{18}F]FDG est inconnu. Les images coronales de ces analyses sont présentées dans la figure 13. Chez le rat éveillé, on remarque l'hétérogénéité attendue entre la matière grise et la substance blanche. Dans la zone corticale du rat éveillé, le CX auditif a la plus forte fixation du [^{18}F]FDG (troisième et quatrième coupes de la seconde rangée). En revanche, l'image du rat anesthésié montre une activité réduite et une diminution de l'hétérogénéité dans presque toutes les régions. Il y a, cependant, une zone qui indique une absorption accrue de [^{18}F]FDG par rapport au rat éveillé (deuxième coupe, rangée du bas). C'est dans la région du noyau vestibulaire, mais l'identification précise de la région doit être déterminé par une méthode à résolution plus élevée, telle que l'autoradiographie quantitative avec 2- ^{14}C -DG. L'effet de l'anesthésie à l'isoflurane sur le rCMRglu dans le noyau vestibulaire n'est pas actuellement connu.

Courbes d'activité au cours du temps

Dans la présente étude, nous avons démontré la faisabilité d'effectuer des prélèvements de sang artériel pendant l'acquisition dynamique en TEP chez les rats en utilisant les techniques de prélèvement sanguin utilisées dans la méthode quantitative par autoradiographie et [^{14}C]-désoxyglucose. Comme l'illustre la figure 15, la radioactivité plasmatique a rapidement augmenté pour être ensuite éliminée rapidement, de façon similaire à ce qui est observé après l'injection de 2- ^{14}C -DG. Il a fallu 1,9 mL de sang pour caractériser complètement la fonction d'entrée. Les études avec [^{14}C]-désoxyglucose chez la souris ont démontré que l'on peut réduire le volume sanguin total d'échantillonnage à 270 μL (Jay, Jouvét et al. 1985). L'expérience développée à partir de ces études sera utile pour adapter les méthodes de TEP pour une utilisation chez la souris.

Les courbes d'activité au cours du temps dans chacun des tissus examinés (cerveau entier, CX, TH, CB, et BS) étaient superposables mais malgré l'effet de volume partiel, elles ne masquent le rôle de l'anesthésie (Maekawa, Tommasino et al. 1986).

Comparaison entre comptage direct des tissus versus l'imagerie TEP

La meilleure corrélation entre les activités mesurées par la TEP et celles mesurées par comptage direct des échantillons de tissus a été obtenue pour le cerveau entier, la région du TH et celle de la BS. Il était attendu que le cerveau, en entier, soit la région la moins sensible aux effets du volume partiel. Le TH, situé dans la partie centrale du cerveau, avait un degré élevé de certitude pour le placement de la ROI. La baisse du taux de récupération dans le CB est peut être due à la difficulté à obtenir une dissection propre qui sépare cette structure de la région adjacente dont l'absorption en [¹⁸F]FDG est très élevée (Fig. 13). L'hétérogénéité diminuée dans le cerveau du rat anesthésié (Maekawa, Tommasino et al. 1986) peut avoir réduit les effets de volume partiel. Néanmoins, nos données prouvent qu'il est possible d'effectuer une étude dynamique en [¹⁸F]FDG avec l'ATLAS parce que les données d'imagerie correspondent bien avec le comptage direct des tissus.

2.1.5 Conclusion

Le but de la présente étude était d'examiner la fiabilité de l'ATLAS pour effectuer une analyse dynamique avec prélèvement de sang artériel pour mesurer la fonction d'entrée. Les résultats montrent que le comptage direct des tissus et la radioactivité de l'analyse des images de l'ATLAS sont bien corrélés. D'autre part, le rCMRglu, calculé par l'analyse graphique de Patlak (Patlak, Blasberg et al. 1983; Patlak and Blasberg 1985), est comparable à celle de l'étude précédemment rapportée (Maekawa, Tommasino et al. 1986). L'ATLAS est un appareil dont la sensibilité et la résolution spatiale permettent une étude dynamique cérébrale chez le rat. Les procédures décrites dans cette étude peuvent également être appliquées à des études quantitatives pour d'autres radiotraceurs.

2.2 Etude d'activation cérébrale par stimulation de vibrisses

Use of [¹⁸F]fluorodeoxyglucose and the ATLAS small animal PET scanner to examine cerebral functional activation by whisker stimulation in unanesthetized rats (§ annexe 3)

2.2.1 Introduction

L'activation neuronale fonctionnelle est normalement associée à des augmentations de l'utilisation cérébrale locale du glucose (*ICMRglc*) et la circulation sanguine (*ICBF*) dans les stations anatomiques des voies neuronales activées. Les augmentations de *ICMRglc* semblent dériver d'une activation de la Na⁺,K⁺-ATPase nécessaire pour restaurer les gradients ioniques dégradés par l'activité de pointes (Sokoloff 1999). Le fait de caresser les vibrisses a conduit à des augmentations substantielles de *ICBF* (local dans les quatre stations de la voie examinée (Adachi, Takahashi et al. 1994). Une augmentation de l'utilisation du glucose dans le cortex somatosensoriel (Melzer, Van der Loos et al. 1985) chez le rat a également été montrée suite à une séance de caresses de vibrisses unilatérales (McCasland, Carvell et al. 1991).

Les changements de *ICMRglc* peuvent refléter des réponses physiologiques à des altérations de l'activité fonctionnelle régionale ou bien des états pathologiques, tels que les tumeurs cérébrales, des foyers épileptiques, etc. Ces changements ont généralement été détectés chez les petits animaux au moyen de la méthode par autoradiographie au [¹⁴C] désoxyglucose ([¹⁴C]DG) (Sokoloff, Reivich et al. 1977), mais avec le développement de la TEP pour petits animaux à haute résolution, de nombreuses études sont actuellement menées avec 2 - [¹⁸F] fluoro-2-désoxyglucose ([¹⁸F]FDG) et TEP (Nikolaus, Beu et al. 2004). Bien que la TEP confère l'avantage de permettre des déterminations répétées longitudinales chez les mêmes animaux, sa résolution spatiale est plus d'un ordre de grandeur inférieur à celui de l'autoradiographie quantitative (Schmidt and Smith 2005). Les changements dans l'absorption du traceur, de faible amplitude ou de faible étendue, peuvent ne pas être détectés par la TEP. La présente étude a été réalisée afin de

déterminer si le Advanced Technology Laboratory Animal Scanner (ATLAS) (Seidel, Vaquero et al. 2003), un scanner TEP pour petits animaux, mis au point au sein des National Institutes of Health, pourrait être utilisé pour détecter des changements, dans l'absorption de [¹⁸F]FDG au niveau du cortex somatosensoriel, provoqués par une stimulation unilatérale de 5, 10, ou 15 moustaches chez le rat. La fixation de [¹⁸F]FDG mesurée avec l'ATLAS a été comparée avec celle de [¹⁴C]DG, déterminée par autoradiographie quantitative.

2.2.2 Matériels et méthodes

Préparation des animaux

Des rats adultes mâles Sprague-Dawley (220-268 g) ont été achetés auprès des Laboratoires Charles River et maintenus dans une pièce à température contrôlée avec nourriture et eau *ad libitum*. Ils ont été privés de nourriture, mais avec libre accès à l'eau pendant 16 h avant la préparation chirurgicale pour les études. Toutes les procédures ont été approuvées par le Centre de soins des animaux et du Comité clinique. Les animaux ont été anesthésiés à l'halothane (5% à induction et 1-1,5% pour la chirurgie mélangé dans 30% O₂/70% N₂O). Des cathéters en polyéthylène (PE 50; Clay Adams) ont été insérés dans les artères fémorales gauche et à droite et dans la veine fémorale gauche. Un cathéter artériel a permis de surveiller la tension artérielle moyenne (MABP) et l'autre a été utilisé pour l'échantillonnage de sang artériel. Le cathéter veineux a été utilisé pour l'injection des traceurs radiochimiques. Après la pose des cathéters, les plaies chirurgicales ont été traitées avec une pommade de lidocaïne 5% et suturées. Toutes les vibrisses sauf 5, 10 ou 15 sur le côté gauche (expérimental) du visage ont été coupées à proximité de la peau; les vibrisses sur le côté droit (contrôle) du visage ont été laissées intactes. Nous avons étudié huit rats, divisés en trois groupes: deux avaient 5 moustaches stimulées, 3 avaient 10 moustaches stimulées et 3 avaient 15 moustaches stimulées. Chaque animal a alors été partiellement immobilisé sur une brique de plomb au moyen d'un plâtre autour de son bassin, pour empêcher la locomotion mais permettre le mouvement libre du haut du corps. Les effets du stress d'immobilisation sur le *ICMRglc*

ont été étudiés en comparant directement l'utilisation cérébrale locale du glucose chez les rats immobilisés et non immobilisés; aucune différence significative n'a été trouvée (Soncrant, Holloway et al. 1988). La durée de l'anesthésie pendant la préparation chirurgicale n'a pas dépassé les 30 min. La température corporelle a été surveillée tout au long des préparatifs de chirurgie et des périodes expérimentales par une sonde rectale et maintenue à 37°C par une lampe de chauffage à commande thermostatique (modèle 73A; Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs OH, USA). Au moins 3h se sont écoulées entre la pose chirurgicale des cathéters et l'étude de stimulation des vibrisses.

Variables physiologiques

La tension artérielle moyenne (MABP) a été surveillée en continu chez tous les animaux avec un analyseur de DigiMed Pression Artérielle (modèle 300; Micro-Med, Louisville, KY, USA). Les tensions artérielles partielles de CO₂ (PaCO₂) et O₂ (PaO₂) et le pH ont été mesurés avec un analyseur de gaz du sang (modèle 288 Système de gaz de sang; Ciba-Corning Diagnostics Corp, Medfield, MA, USA). L'hématocrite a été déterminé au moyen d'échantillons de sang artériel centrifugé (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). La concentration artérielle plasmatique de glucose a été déterminée avec un analyseur de glucose Beckman 2 (Beckman Instruments).

Procédure expérimentale

La phase expérimentale a été initiée au moins trois heures après la pose des cathéters pour permettre un temps de récupération vis à vis de l'anesthésie. Les radiotraceurs ont été administrés par injection intraveineuse d'un mélange de 0,5 ml contenant ~82,5 MBq de [¹⁸F]FDG et ~ 1184 kBq de [¹⁴C]DG. En simultanément, la stimulation unilatérale des moustaches (5, 10 ou 15) restantes sur le côté gauche du visage a été lancée. La stimulation a continué pendant toute la période expérimentale pour une durée de 45 min. La stimulation des vibrisses a été réalisée au moyen d'une brosse à dents électrique modifiée vibrant à une fréquence de 10 Hz. Les échantillons de sang artériel pour la détermination de PaO₂, PaCO₂, pH, de l'hématocrite et des concentrations de

glucose ont été prélevés immédiatement avant l'injection du radiotracer ainsi que 35 minutes plus tard. D'autres échantillons supplémentaires ont été prélevés pour monitorer la concentration de glucose et de radioactivité pendant l'étude. Les échantillons de sang ont été collectés dans un tube à centrifuger en polyéthylène recouvert d'héparine-lithium-fluorure (Beckman Instruments) et centrifugés dans la centrifugeuse Beckman Microfuge B (Beckman Instruments) pour séparer le plasma. Le volume sanguin total échantillonné a été d'environ 1,6 ml. Quarante-cinq minutes après l'injection des traceurs radioactifs et l'initiation de la stimulation des moustaches, le rat a reçu une injection intraveineuse de la solution d'euthanasie. La chronologie de la procédure expérimentale est illustrée dans la figure 17.

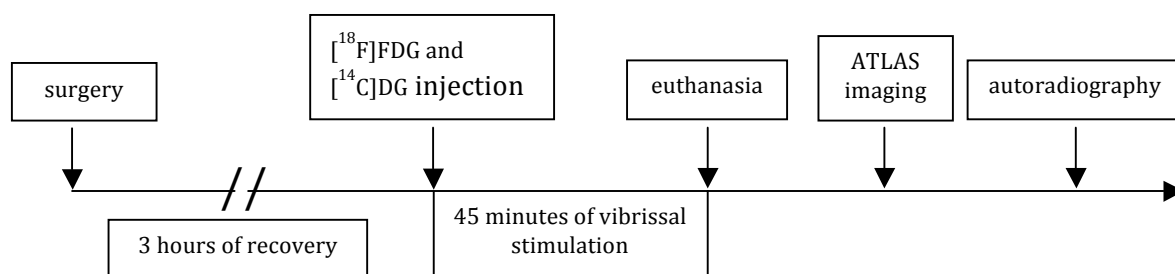


Figure 17. Timeline of the experimental procedure.

Chronologie du protocole d'étude.

TEP

Immédiatement après l'euthanasie, les rats ont été placés supins sur le lit de l'ATLAS où une acquisition statique cérébrale a été effectuée pendant 40 min.

Les images TEP ont été reconstruites en 3D-OSEM (Johnson, Seidel et al. 2002). Aucune correction d'atténuation n'a été faite. Les coups détectés par l'ATLAS ont été convertis en MBq/cc par l'utilisation d'un facteur de calibration croisée (325,63 cps scanner/cc par MBq/cc) déterminé précédemment dans une étude de fantôme. Des ROIs ont été placées sur des reconstructions coronales cérébrales de 1,125 mm d'épaisseur. Les ROIs ont été également placées sur la région analogue au niveau de l'hémisphère

controlatéral. L'augmentation, en pourcentage, évoquée par la stimulation unilatérale des moustaches a été calculée de la façon suivante:

$$\text{Effet \%} = 100 \times [(C_{\text{stim}} - C_{\text{unstim}}) / C_{\text{unstim}}]$$

où C_{stim} = concentration de $[^{18}\text{F}]$ dans le cortex somatosensoriel stimulé et C_{unstim} = concentration de $[^{18}\text{F}]$ dans le cortex somatosensoriel non stimulé.

Autoradiographie

A la fin de l'acquisition, le cerveau a été extrait de la boîte crânienne, congelé dans l'isopentane à -40°C , et monté sur un support pour cryostat. Les cerveaux ont été ensuite sectionnés en coupes coronales de $20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, et immédiatement séchées. Ces coupes ont été exposées à un film pour autoradiographie avec $[^{14}\text{C}]$ (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA). Les films autoradiographiques ont été numérisés avec le scanner DuoScan films T1200 (AGFA, Ridgefield Park, NJ, USA) en unités de densité optique, et les concentrations cérébrales locales ont été calculées à partir des densités optiques des tissus locaux et celles des normes de référence calibrées avec $[^{14}\text{C}]$.

La fixation du radiotracer au niveau du cortex somatosensoriel a été mesurée en dessinant une ROI autour la région activée; une région analogue a été placée controlatéralement. Le pourcentage des augmentations évoquées par la stimulation unilatérale des moustaches a été calculé à partir des différences de concentration en $[^{14}\text{C}]$ au niveau des côtés stimulés et non stimulés comme décrit ci-dessus.

Analyses statistiques

La signification statistique des changements dans les variables physiologiques déterminées dans les échantillons de sang prélevés chez chaque rat immédiatement avant et 35 minutes après le début de la période d'expérimentation a été évaluée par des tests t de Student pour données appariées. Les effets de la stimulation unilatérale des vibrisses ont été déterminés dans chaque animal en calculant les pourcentages des différences entre les concentrations de traceur radioactif au niveau du cortex stimulé par rapport à

celui non stimulé. Les effets de la stimulation corticale sur l'utilisation du glucose ont été évalués statistiquement par des tests appariés *t* de Student. Les différences entre les effets de la stimulation déterminée avec [¹⁴C]DG autoradiographie et avec [¹⁸F]FDG-TEP ont été statistiquement comparées par des tests *t* de Student sur les logarithmes des pourcentages des différences entre les deux traceurs.

2.2.3 Résultats

Variabes physiologiques

La tension artérielle moyenne, la température centrale du corps, l'hématocrite du sang artériel, la PaO₂, la PaCO₂ et le pH sont reportés au tableau 6. Il n'y avait aucune différence significative au niveau de la température du corps, des tensions des gaz du sang, ou du pH entre les mesures prises immédiatement avant le début de la période expérimentale et celles prises à 35 min plus tard (Tab. 6). Il y avait, cependant, quelques changements, petits mais statistiquement significatifs, en ce qui concerne certaines autres variables physiologiques entre la première et seconde mesure, à savoir une baisse de 14% de l'hématocrite ($p < 0,001$), soit une baisse de 9% en MABP ($p < 0,001$), et une augmentation de 10% dans le niveau de glucose plasmatique artériel ($p < 0,001$), tous probablement secondaires à la petite quantité de sang perdu pendant l'étude.

Table 6. Physiological variables of the rats.**Variables physiologiques des rats.**

Time of Measurement	Mean Arterial Blood Pressure (MABP) (mmHg) (n=7)	Body Temperature (°C) (n=7)	Hematocrit (%) (n=5)	Arterial Plasma Glucose Concentration (mg/dL) (n=6)	Arterial Blood		
					pH (n=8)	P _A CO ₂ (mmHg) (n=6)	P _A O ₂ (mmHg) (n=7)
Immediately prior to onset of experimental period	120±6	36.9±0.1	50±4	142±13	7.37±0.05	42±3	78±4
35 min after onset of experimental period	110±3*	37.0±0.1	43±2*	156±6*	7.37±0.03	38±5	82±6

Values are means ± standard deviations for the number of animals indicated.

* Indicates statistically significant change ($p < 0.001$ by Student's t test).

Comparaison de l'augmentation de l'absorption du traceur mesurée par ATLAS ([¹⁸F]FDG) et par l'autoradiographie ([¹⁴C]DG)

Trois groupes de rats ont été étudiés. Un groupe avait eu 5 vibrisses stimulées unilatéralement, un autre 10 et le dernier 15. Dans le groupe avec 5 moustaches, la différence de fixation du radiotracer au niveau du cortex somatosensoriel entre le côté stimulé et celui non-stimulé était visuellement apparente avec la méthode autoradiographique, malgré le p non significatif ($p = 0,075$, test de Student t apparié). Les différences de fixation du radiotracer étaient également visibles sur les images [¹⁸F]FDG-ATLAS. Lorsque 10 ou 15 moustaches étaient stimulées, les différences étaient statistiquement significatives pour l'autoradiographie avec [¹⁴C]DG (10 moustaches, $p < 0,05$; 15 moustaches, $p < 0,01$). Avec [¹⁸F]FDG-ATLAS, le seuil statistique n'était atteint qu'après stimulation de 15 moustaches ($p < 0,01$). Puisque chaque moustache projette dans une région propre au niveau du cortex somatosensoriel, plus le nombre de moustaches stimulées augmente, plus la taille de la zone activée au niveau du cortex sensoriel est importante. Ceci est en accord avec l'élargissement de la zone activée au niveau du cortex somatosensoriel (Tab. 7). Avec [¹⁸F]FDG-ATLAS, la stimulation de 10

moustaches a produit une activation de zones de $2,5 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ (moyenne \pm SD, n = 3) et la stimulation de 15 a produit une activation de zones de $2,7 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ (moyenne \pm SD, n = 3) (Fig. 18). Les différences en pourcentage entre les deux traceurs n'ont atteint une différence statistique que pour les groupes de 10 et 15 vibrisses (p <0,05 et p <0,001, respectivement) (Tab. 7).

Table 7. Comparison of sensitivities of ATLAS/PET [^{18}F]FDG scanning and [^{14}C]DG autoradiography in detection of functional activation in somatosensory cortex by unilateral whisker stimulation in the rat.

Comparaison des sensibilités de l'imagerie par ATLAS/TEP [^{18}F]FDG et celle par autoradiographie avec [^{14}C]DG.

No. of Whiskers Stimulated	Animal	ATLAS/PET [^{18}F]FDG Scan		[^{14}C]DG Autoradiography
		Activated Volume (mm^3)	Percent difference in labeling between stimulated and unstimulated side	Percent difference in labeling between stimulated and unstimulated side
5	A-7	0.7	19%	41%
	B-9	1.1	23%	29%
	Mean \pm SD	0.9 ± 0.3	$21 \pm 3\%$	$35 \pm 9\%$ N.S.
		0.88 ± 0.25		
10	D-4	2.5	9%	50%
	E-8	2.1	27%	---
	F-10	2.8	13%	60%
	Mean \pm SD	2.5 ± 0.4	$16 \pm 10\%$	$55 \pm 7\%$ **
15	G-6	3.2	19%	45%
	H-11	3.2	18%	65%
	I-12	1.8	23%	57%
	Mean \pm SD	2.7 ± 0.8	$20 \pm 3\%$	$56 \pm 10\%$ ***

N.S., not significant.

**Statistically significantly higher than that detected with PET, p<0.05.

***Statistically significantly higher than that detected with PET, p<0.001.

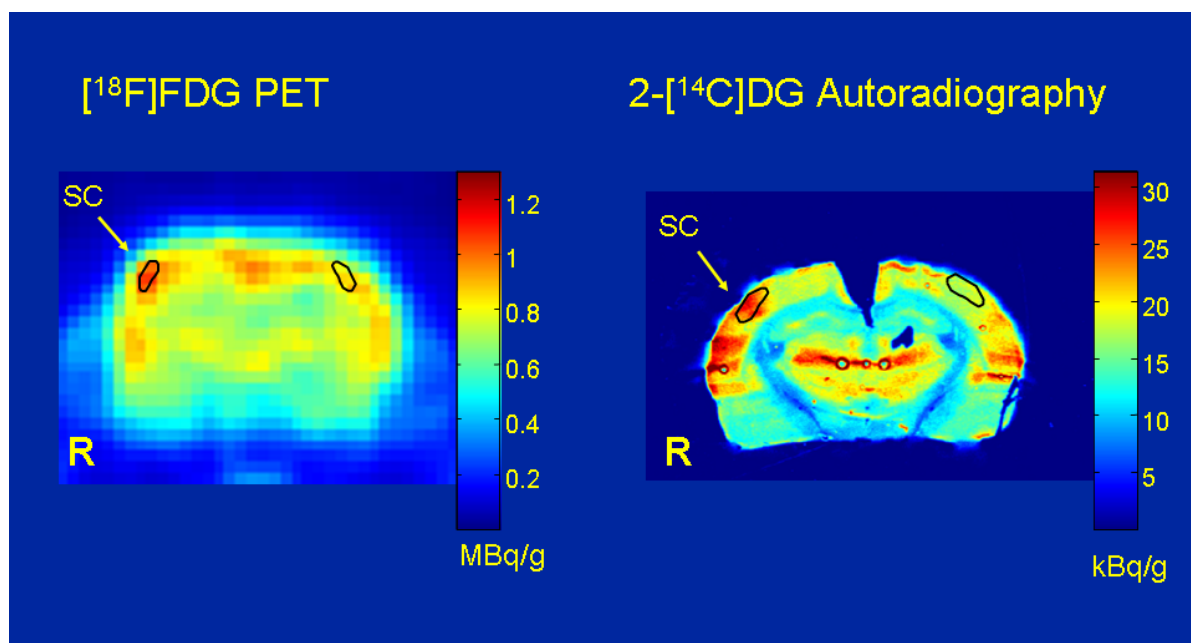


Figure 18. Comparison of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ALTAS PET image with the autoradiographic $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ image in the same rat.

The two tracers were co-injected. During tracer uptake the animal was conscious, and 15 whiskers on the left side of the face were stroked at 10 Hz. After 45 minutes the animal was killed, placed on the scanner bed and scanned for 40 minutes with the ATLAS small animal PET scanner. The brain was then removed for ^{14}C autoradiography. Unilateral whisker stroking increases ICMR_{glc} in the barrel field of the somatosensory cortex (SC) on the side contralateral to the stimulation. In the animal shown, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ uptake measured in the PET study was 19% higher in SC on the stimulated side compared to unstimulated side whereas the ^{14}C autoradiograms showed a 45% increase. The small area of activation can be detected by small animal PET, but due to partial volume effects, the magnitude of increase is not as great as that measured with quantitative autoradiography.

Vue d'une coupe cérébrale chez le rat en ATLAS/TEP $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ et par autoradiographie avec $[^{14}\text{C}]\text{DG}$.

2.2.4 Discussion

L'imagerie cérébrale fonctionnelle quantitative se base souvent sur les changements régionaux dans l'utilisation du glucose, imagés par $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ en autoradiographie chez les animaux ou $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ chez les humains. L'autoradiographie ne permet qu'une seule session d'imagerie par animal alors que la TEP permet des études répétées. Les études répétées chez le même animal ont, cependant, été limitées par le nombre d'échantillons de sang qui peuvent être prélevés. L'application de méthodes pour contourner le besoin d'échantillonner le sang (pour caractériser la fonction d'entrée artérielle) (Kim, Herrero

et al. 2006; Su, Lee et al. 2009), pourrait augmenter l'utilisation de la TEP chez le petit animal pour des études répétées.

Dans la présente étude, nous avons comparé la capacité de l'ATLAS de détecter l'activation corticale sensorielle chez le rat pendant la stimulation des vibrisses en rapport à la méthode d'autoradiographie avec [¹⁴C]DG. Kornblum et coll. (Kornblum, Araujo et al. 2000) ont également montré que l'activation métabolique au niveau du cortex somatosensoriel, suite à la stimulation unilatérale des vibrisses de rats, peut être détecté par [¹⁸F]FDG-TEP pour petits animaux. Cependant, cette équipe n'a pas rapporté le nombre de vibrisses stimulées ni comparé les résultats avec ceux obtenus par autoradiographie. Dans la présente étude, nous avons essayé de définir les limites de la sensibilité de la technique [¹⁸F]FDG-ATLAS en faisant varier le nombre de moustaches stimulées afin de déterminer le nombre minime nécessaire pour produire des changements détectables au niveau du cortex somatosensoriel chez un rat éveillé et en comparant les résultats avec ceux obtenus dans les mêmes rats par autoradiographie avec [¹⁴C]DG. L'ATLAS a été suffisamment sensible pour détecter une augmentation de fixation du radiotracteur au niveau du côté stimulé (pour 5, 10 et 15 moustaches) même si les pourcentages des différences entre côté stimulé et côté non stimulé étaient inférieurs à ceux obtenus avec la méthode autoradiographique. Cette différence de magnitude s'explique probablement par la mineure résolution spatiale de la TEP et sa majeure sensibilité aux effets de volume partiel. Pain et al. (Pain, Besret et al. 2002) ont trouvé un écart similaire entre les données obtenues avec une sonde bêta et en autoradiographie chez le rat sous anesthésie avec α -chloralose.

Il convient de noter que la TEP dynamique n'a pas été utilisée dans la présente étude. En effet, une acquisition statique TEP a été effectuée immédiatement à la fin de la période de 45 minutes de fixation du traceur, un moment où les animaux peuvent être immobilisés par une anesthésie ou l'euthanasie, avec très peu ou aucun effet sur la distribution du traceur (Matsumura, Mizokawa et al. 2003). Cette procédure a été choisie pour éviter la nécessité d'utiliser une anesthésie pour immobiliser l'animal pendant la période critique de fixation du traceur par le cerveau (lors de la stimulation). Les agents

anesthésiques généraux sont normalement utilisés dans le but de supprimer spécifiquement les fonctions sensorielles, donc ceci pourrait supprimer ou au moins modifier l'activation fonctionnelle cérébrale. En effet, Nakao et al. (Nakao, Itoh et al. 2001) ont constaté que même le α -chloralose, un agent anesthésique connu pour avoir un moindre effet dépresseur sur l'activité neuronale, réduit sensiblement le flux sanguin et des réactions métaboliques au niveau du cortex somatosensoriel suites à la stimulation des vibrisses à tel point que l'activation est à peine détectable. Shimoji et al. (Shimoji, Ravasi et al. 2004) ont également observé une diminution de la captation de l'isoflurane en utilisant le [^{18}F]FDG-ATLAS. En attendant de pouvoir imager les animaux en TEP sans avoir besoin de les immobiliser avec des agents anesthésiques, il est conseillé de scanner après une période de fixation du traceur cérébrale au cours de laquelle les animaux sont dans un état conscient.

2.2.5 Conclusion de l'étude

Cette étude a démontré que l'ATLAS est en mesure de détecter des activations neuronales fonctionnelles localisées dans des volumes très petits, tel que celui de l'effet de la stimulation de seulement cinq moustaches. En raison des effets de volume partiel, cependant, l'ampleur de l'augmentation de la fixation du traceur est plus faible quand elle est mesurée avec l'ATLAS par rapport à celle relevée à travers l'autoradiographie par [^{14}C]DG.

3 Etude de caractérisation du FP-TZTP in vivo chez le rongeur

Imaging of the muscarinic acetylcholine neuroreceptor in rats with the M2 selective agonist [¹⁸F]FP-TZTP (§ annexe 4)

3.1 Introduction

Les paramètres biochimiques quantitatifs, tels que le potentiel de liaison, le volume de distribution, et les ratios de distribution ont été extraits de données collectées *in vivo* chez les singes et chez l'homme, en combinant l'imagerie externe et l'échantillonnage du sang artériel (Carson 1996). Les études d'imagerie en série permettent de mesurer l'effet des traitements chez le même sujet, ce qui augmente la puissance statistique. Chez les petits animaux, ce même type d'études est peu répandu à cause de la difficulté à déterminer la fonction d'entrée corrigée par les métabolites (donc échantillonnage artériel couplé à l'analyse de métabolites dans un volume sanguin très limité). Grâce à l'élaboration de procédures d'extraction qui permettent la détermination de la concentration du traceur "parent" avec des quantités relativement petites de sang (Ma, Kiesewetter et al. 2002), nous avons évalué les conditions expérimentales qui permettraient le calcul du modèle cinétique complet ainsi que des ratios de distribution à l'équilibre chez les rats pour un agoniste muscarinique sélectif pour le sous type M2, le 3 - (3 - (3 - [¹⁸F] fluoro) thio) - 1,2,5-thiadiazole-4-yl) -1,2,5,6-tétrahydro-1-méthylpyridine ([¹⁸F]FP-TZTP).

Auparavant, nous avons démontré que les paramètres biochimiques pouvaient être extraits en utilisant l'ATLAS (Seidel, Vaquero et al. 2003), et [¹⁸F]FDG (Shimoji, Ravasi et al. 2004). La fonction d'entrée à partir du plasma a été déterminée par échantillonnage de sang au cours du temps. Il n'était pas nécessaire d'analyser les métabolites parce que le FDG n'a pas de métabolites présents dans le plasma.

Le [¹⁸F]FP-TZTP est un radioligand sélectif pour le récepteur muscarinique M2, comme prouvé par autoradiographie *ex vivo* dans des études antérieures avec des souris knock-out (Jagoda, Kiesewetter et al. 2003). Le système muscarinique central est impliqué dans plusieurs maladies, comme la MA (Cohen, Podruchny et al. 2003) et la

dépression (Cannon, Carson et al. 2006; Drevets, Price et al. 2008). En particulier pour la MA, il est crucial d'identifier les méthodologies appropriées pour l'évaluation *in vivo*, en préclinique, des effets des traitements potentiels "disease-modifier". L'objectif de cette étude est de développer une méthodologie applicable aux rats, afin de mesurer la cinétique cérébrale du FP-TZTP, en tant qu'indice de liaison au récepteur. Pour cela, nous avons utilisé l'ATLAS pour l'acquisition d'images cérébrales de rat, *ex vivo* et *in vivo*, après injection intraveineuse de [¹⁸F]FP-TZTP. Nous avons également étudié l'effet de l'isoflurane sur les ratios de distribution du FP-TZTP, puisque toutes les acquisitions dynamiques *in vivo* nécessitent que les rongeurs soient sous anesthésie. Puisque le [¹⁸F]FP-TZTP quitte le sang rapidement (Shimoji, Esaki, et al. 2003) et est rapidement métabolisé (Carson, Kiesewetter et al. 1998), nous avons effectué 1) des injections en bolus où le sang a dû être prélevé rapidement et fréquemment, et 2) des perfusions constantes dans lesquelles les prélèvements sanguins nécessaires ont été moins nombreux et moins fréquents.

3.2 Matériels et méthodes

Produits chimiques

L'halothane et l'isoflurane (Forane) ont été achetés chez Baxter et la solution pour l'euthanasie (Beuthanasia-D) chez Schering-Plough. [¹⁸F]FP-TZTP a été synthétisé selon une méthode précédemment publiée (Kiesewetter, Vuong et al. 2003).

Caractéristiques de l'ATLAS

L'ATLAS a un anneau de 11,8 cm de diamètre, avec 8 cm d'ouverture, un champ de vue de 6 cm en transversal et de 2 cm en axial. La résolution spatiale de ce système est de 1,8 mm de largeur à mi-hauteur (FWHM) en rétroprojection filtrée et de 1,5 mm en OSEM 3D (Yao, Seidel et al. 2000) (Yao, et al. 2000). Pour l'étalonnage d'activité de l'ATLAS, un cylindre de 3,1 cm de diamètre par 7,5 cm de long a été utilisé pour simuler la tête de rat et son torse. Ce cylindre, rempli de ¹⁸F dans l'eau, est centré dans l'anneau du scanner et

imagé. La radioactivité dans le cylindre a été déterminée par un calibreur de dose, et cette valeur a été divisée par le volume du cylindre pour donner la concentration. A partir de ces données, un facteur d'étalonnage (C) a été déterminé de sorte à pouvoir calculer la concentration pour toute nouvelle image, en multipliant les coups par seconde (cps) dans un voxel donné de cette image par le facteur d'étalonnage C. Ce facteur de calibration a été déterminé périodiquement et ne varie pas significativement avec le temps.

Préparation des animaux

Des rats adultes (220-268 g) mâles Sprague-Dawley ont été achetés auprès des Laboratoires Charles River et maintenus dans une pièce à température contrôlée avec nourriture et eau ad libitum. Toutes les procédures ont été approuvées par le Centre de soins des animaux et du Comité clinique. Les animaux ont été anesthésiés à l'halothane (5% à l'induction et 1-1,5% pour la chirurgie, mélangé avec 30% O₂/70% N₂O). Des cathéters en polyéthylène (PE 50; Clay Adams) ont été insérés dans les artères fémorales gauche et à droite et dans la veine fémorale gauche. Un cathéter artériel a été utilisé pour surveiller la tension artérielle moyenne (MABP) et l'autre a été utilisé pour l'échantillonnage de sang artériel. La longueur du cathéter utilisé pour le prélèvement sanguin a été fixée précisément à 16 cm afin de minimiser les erreurs d'échantillonnage. Le cathéter veineux a été utilisé pour l'injection du [¹⁸F]FP-TZTP. Les cathéters ont été placés sous la peau pour permettre à l'animal de se déplacer librement sans endommager les cathéters.

Variables physiologiques

La tension artérielle était surveillée en continu avec un analyseur de tension (modèle 300; Micro-Med). CO₂, O₂ et pH ont été mesurés avec un analyseur de gaz du sang (modèle 288 Système de gaz de sang; Ciba-Corning Diagnostics Corp.) L'hématocrite a été déterminé dans des échantillons de sang artériel centrifugé dans une Microfuge B (Beckman Instruments). La concentration artérielle de glucose plasmatique a été déterminée avec un analyseur de glucose Beckman 2 (Beckman Instruments). Les autres

variables physiologiques ont été mesurées juste avant l'injection du radiotracer ainsi que toutes les 15 minutes.

Études TEP

Les acquisitions TEP ont été réalisées chez 19 rats. Après au moins 3 heures de la pose des cathéters, le rat a été endormi avec de l'isoflurane et placé supin sur le lit de l'ATLAS. Pour les études en bolus, [¹⁸F]FP-TZTP (61±7 MBq; 300-600 µL dans le volume, la masse injectée était environ 1 nmol.) Pour les études de perfusion, le [¹⁸F]FP-TZTP (148 ± 18 MBq en 2 ml - masse injectée 2 nmol) a été administré en permanence à l'aide d'un cathéter veineux à un taux de 60 µL/min pendant 30 minutes, à 40 µL/min pendant 45 minutes et à 15µL/min pendant 120 minutes, selon la durée de l'étude. Les acquisitions d'images ont duré 30 minutes pour un groupe, 45 minutes pour le second groupe et 120 minutes pour le troisième groupe. Après le dernier scan, le rat a été sacrifié par injection veineuse en bolus de solution d'euthanasie.

Pour visualiser les effets de l'anesthésie à l'isoflurane sur l'absorption et la distribution de [¹⁸F]FP-TZTP, nous avons réalisé des acquisitions statiques *ex vivo* de la tête ou directement du cerveau, extrait du crâne immédiatement après la mort, de durée variables (15 à 60 minutes) pour plupart des rats ayant reçu l'injection en bolus sous isoflurane et de tous ceux qui étaient éveillés pendant l'absorption. De même, tous les rats perfusé, indépendamment de la durée de la perfusion et de leur état lors de l'absorption, ont eu une acquisition TEP *ex vivo* de 15 minutes commençant immédiatement après leur sacrifice.

Echantillonnage du sang artériel

Le protocole d'échantillonnage du sang, pour les études injectées en bolus, afin de déterminer les courbes d'activité dans le sang et dans le plasma, a été le suivant: 12 prélèvements au cours de la 1^{ère} min et 6 échantillons supplémentaires toutes les 5 minutes. Pour les études de perfusion, lorsque la durée était de 30 min, le protocole prévoyait un prélèvement toutes les 5 minutes avec le dernier échantillon en triple.

Lorsque l'étude durait 45 minutes, les deux premiers échantillons étaient prélevés à un intervalle de 10 minutes, suivi par un intervalle de 5 minutes après 30 minutes et un échantillonnage triple à 45 minutes. Lorsque les études étaient de 120 minutes, les prélèvements survenaient à 25, 45, 60, 75, 90 et 120 minutes. Les échantillons de sang, d'environ 80-100 μL , se trouvaient dans des microtubes en polyéthylène recouverts d'héparine-lithium-fluorure (Beckman Instruments, Inc). 20 μL de sang total ont été utilisés pour l'extraction des métabolites et 10 μL ont été comptés dans un γ -counter (modèle 1480; PerkinElmer Life Sciences Inc.). Le reste du sang entier a été centrifugé afin d'en séparer le plasma et ce dernier a servi pour en extraire les métabolites et le comptage de l'activité. Le plasma restant a été utilisé pour la mesure de la concentration de glucose comme une indication de la physiologie normale (Sokoloff, Reivich et al. 1977). Afin de minimiser les pertes de sang, tout le sang collecté dans les volumes morts et recueilli dans le processus d'échantillonnage a été réinjecté par voie intraveineuse dans l'animal.

Comptage direct des tissus et autoradiographie

Pour les études par injection en bolus, immédiatement après le sacrifice du rat ou à la fin de l'acquisition *ex-vivo* de 15 minutes, le cerveau était extrait du crâne et séparé en deux parties, chacune comprenant un hémisphère et la moitié du cervelet (CB) et du tronc cérébral (BS). Une partie était ultérieurement disséquée pour séparer le thalamus (TH), le cortex (CX), le CB et le BS. Ces structures ont été pesées et comptées dans un γ -counter (modèle 1480; PerkinElmer Life Sciences Inc.). La partie restante du cerveau a été comptée comme un seul morceau. La concentration régionale de la radioactivité a été utilisée à des fins de biodistribution. Toutes les activités ont été exprimées en MBq/mL, en supposant que la densité du tissu est égale à 1.

Pour les études de perfusion constante, une moitié du cerveau a été congelée dans l'isopentane maintenu à -40°C avec de la glace sèche jusqu'à la coupe. Les cerveaux ont été coupés en sections sagittales de 20 μm d'épaisseur dans un cryostat. Les coupes, montées sur des lamelles de verre, et séchées à l'air, ont été exposées à des films pour

imagerie à phosphorescence Fuji pour un temps enregistré, environ 20 heures. Ces films, lus avec un appareil Fuji Film BAS-5000 (Fuji Film Medical Systems USA Inc.), ont été analysés avec le logiciel d'image Science Lab 2001, version 4.0. Des ROIs ont été placées sur les images numériques des sections cérébrales au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale, du noyau caudé-putamen, du cortex somato-sensoriel, du thalamus, du tronc cérébral, du cervelet, et du colliculus inférieur et supérieur. La rétention de radioactivité a été exprimée en photoluminescence stimulée par mm carré (psl/mm²). Les psl/mm² ont été convertis en MBq/mL par l'utilisation d'un facteur d'étalonnage calculé pour chaque étude en dessinant une ROI autour d'une quantité connue de radioactivité posée sur une lamelle de verre et exposées au film simultanément aux coupes cérébrales.

Analyse des données TEP

Les coups détectés par le scanner ont été convertis en MBq/mL par l'utilisation d'un facteur de calibration croisée (325,6 cps scanner/mL par MBq/ml) déterminé à l'aide d'un fantôme comme détaillé précédemment. Pour les études injectées en bolus, une image sommée sur l'ensemble de l'intervalle de 30 minutes a été construite pour le placement des ROIs. Les ROIs ont ensuite été transférées à la séquence dynamique et l'activité moyenne pondérée des tissus a été calculée. Une ROI de bruit de fond, pour les contributions des événements en coïncidence aléatoire et de dispersion a été monitorée, et a été jugée très faible tout au long des études.

Les courbes d'activité tissulaires ont été construites en soustrayant l'activité de fond de l'activité mesurée dans chaque structure.

Extraction de métabolites: une procédure en 2 étapes

Les métabolites du FP-TZTP chez les rats ont déjà été décrits (Ma, Kiesewetter et al. 2002) et une procédure d'extraction pour la détermination de la fraction "parent" a également été rapportée (Ma, Kiesewetter et al. 2003). En bref, une aliquote de 20 µl de sang total ou de plasma (séparé du sang après centrifugation) ont été mélangée avec 200 µl de solution tampon borate (pH = 12,5) et avec 500 µl d'une solution d'hexane et

d'acétate d'éthyle. Le mélange a été agité au vortex, centrifugé et les couches séparées, la phase organique supérieure contient le composé parent et un métabolite diméthylé. 20 µl d'anhydride acétique ont été ajoutés à la phase organique et après quelques minutes, 500 µl de HCl 0,1 M. Le mélange a été agité et centrifugé. La conversion de l'amine secondaire du métabolite diméthylé en amide a permis d'isoler le "parent" en milieu acide-aqueux. L'activité de cette seconde phase aqueuse a été divisée par la somme des activités des 3 phases pour déterminer le pourcentage du "parent" dans tous les échantillons de plasma et de sang. Dans un excès de précision, nous avons aussi compté un échantillon de plasma ou de sang, puis comparé les comptages de la somme des chiffres des 3 phases. Les résultats n'étaient pas significativement différents.

Analyses statistiques

Des tests *t* de Student appariés et non, à deux extrémités, ont été utilisés pour comparer la radioactivité dans le sang et la distribution radioactive dans les régions cérébrales, sous différentes conditions (éveillé ou sous isoflurane). Les résultats ont été considérés significatifs pour $p < 0,005$.

3.3 Résultats

a) Paramètres physiologiques et doses de radioactivité injectées pour les deux méthodes d'administration

La tension artérielle moyenne (MABP), l'hématocrite, les tensions de gaz artériel et le pH des dix rats qui ont reçu une injection en bolus d'environ 62 MBq de [¹⁸F]FP-TZTP et des quinze rats qui ont reçu environ 138 MBq de [¹⁸F]FP-TZTP en perfusion constante, sont reportés dans le tableau 8. De même, le taux de glucose plasmatique a été mesuré pour tous les rats, sauf les quatre qui ont reçu une perfusion constante de plus de 45 minutes en raison d'un problème technique de l'appareil le jour de ces études. Les valeurs ne diffèrent pas de celles normales attendues. La MABP, inférieure chez les rats anesthésiés par rapport à ceux éveillés, est conforme à l'effet de l'isoflurane.

Table 8. Physiological parameters.

Paramètres physiologiques.

Parameters	Bolus injection method		Constant infusion method			
	Awake mean \pm STD n=5	ISO mean \pm STD n=5	Awake for 30 min mean \pm STD n=4	ISO for 30 min mean \pm STD n=4	ISO for 45 min mean \pm STD n=4	ISO for 120 min mean \pm STD n=3
Injected activity (MBq)	64 \pm 7.4	61 \pm 3.7	132 \pm 11	147 \pm 15	136 \pm 30	140 \pm 15
Weight (g)	205 \pm 28	214 \pm 38	311 \pm 25	287 \pm 9	327 \pm 31	353 \pm 31
Body temperature ($^{\circ}$ C)	36.7 \pm 0.3 ^a	36.5 \pm 1.0 ^a	37.2 \pm 0.4 ^a	36.6 \pm 0.5 ^a	36.9 \pm 0.1 ^a	36.6 \pm 0.4 ^a
	36.6 \pm 0.4 ^b	36.1 \pm 0.1 ^b	37.2 \pm 0.4 ^b	37.1 \pm 1.1 ^b	36.8 \pm 0.4 ^b	36.8 \pm 0.1 ^b
Mean Arterial Blood Pressure (mmHg)	164 \pm 8 ^a	88 \pm 8 ^a	110 \pm 9 ^a	81 \pm 4 ^a	99 \pm 11 ^a	99 \pm 3 ^a
	159 \pm 9 ^b	86 \pm 15 ^b	107 \pm 9 ^b	76 \pm 3 ^b	99 \pm 11 ^b	95 \pm 1 ^b
Hematocrit	0.43 \pm 0.04 ^a	0.43 \pm 0.04 ^a	0.5 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.04 ^a	0.47 \pm 0.01 ^a	0.47 \pm 0.05 ^a
	0.38 \pm 0.06 ^b	0.39 \pm 0.01 ^b	0.7 \pm 0.05 ^b	0.43 \pm 0.03 ^b	0.43 \pm 0.01 ^b	0.41 \pm 0.05 ^b
Plasma glucose	84 \pm 10 ^a	82 \pm 2 ^a	100 \pm 22 ^a	123 \pm 28 ^a	Not measured	172 \pm 12 ^a
	91 \pm 19 ^b	84 \pm 8 ^b	93 \pm 17	123 \pm 29		188 \pm 7
pCO ₂ (mmHg)	42 \pm 4 ^a	53 \pm 10 ^a	35 \pm 2 ^a	50 \pm 3 ^a	64 \pm 7 ^a	49 \pm 15 ^a
	41 \pm 3 ^b	54 \pm 6 ^b	33 \pm 2 ^b	48 \pm 2 ^b	61 \pm 5 ^b	56 \pm 9 ^b
pO ₂ (mmHg)	76 \pm 3 ^a	160 \pm 17 ^a	78 \pm 4 ^a	213 \pm 19 ^a	186 \pm 43 ^a	180 \pm 3 ^a
	78 \pm 5 ^b	145 \pm 19 ^b	83 \pm 7	221 \pm 24	237 \pm 10	256 \pm 14
pH	7.33 \pm 0.2 ^a	7.21 \pm 0.7 ^a	7.41 \pm 0.2 ^a	7.29 \pm 0.2 ^a	7.26 \pm 0.01 ^a	7.35 \pm 0.09 ^a
	7.32 \pm 0.02 ^b	7.20 \pm 0.05 ^b	7.41 \pm 0.04 ^b	7.26 \pm 0.03 ^b	7.24 \pm 0.01 ^b	7.28 \pm 0.05 ^b

^a at injection time, ^b at killing time

b) Méthode d'administration: injection en bolus

Suite à l'administration par injection intraveineuse en bolus, le pourcentage de [¹⁸F]FP-TZTP dans le sang des rats éveillés était similaire à celui chez les rats sous isoflurane. Les métabolites au cours de la première minute étaient légèrement supérieurs (p=0,044 à 0,5 min, p=0,041 à 1 min) chez les rats éveillés par rapport à ceux anesthésiés (Tab. 9).

Table 9. [¹⁸F]FP-TZTP as a percentage of total radioactivity in whole blood after a bolus injection in ISO and Awake rats.

Pourcentage de [¹⁸F]FP-TZTP par rapport à la radioactivité totale dans le sang chez les rats sous anesthésie ou en état d'éveil lors de l'injection en bolus.

Time (min)	ISO rats mean ± STD n=5	Awake rats mean ± STD n=5
0.5	*83.39 ± 4.47 %	*76.08 ± 5.20 %
1	*53.39 ± 8.34 %	*40.81 ± 8.03 %
2	27.14 ± 6.92 %	26.08 ± 7.94 %
5	13.95 ± 2.16 %	14.47 ± 3.23 %
10	7.84 ± 1.18 %	9.18 ± 1.85 %
15	6.84 ± 0.91 %	7.05 ± 0.92 %
20	5.08 ± 1.13 %	5.74 ± 1.03 %
25	3.94 ± 0.54 %	4.73 ± 0.91 %
30	3.71 ± 0.72 %	3.79 ± 0.86%

*p<0.05 of unpaired Student's t test.

Seul le sang total a été analysé en raison de la rapidité de la clairance et du métabolisme du radiotracteur. L'activité du tissu utilisé pour calculer les ratios de distribution (c'est à dire le numérateur) a été évaluée directement (biodistribution) (Fig. 19) ou indirectement par imagerie ATLAS (Fig. 20). La figure 20 illustre les coupes sagittales cérébrales de deux rats *ex vivo*, pour visualiser l'effet de l'isoflurane sur la distribution de [¹⁸F]FP-TZTP dans le cerveau de rat, 30 minutes après injection en bolus.

Les données de biodistribution du FP-TZTP dans les régions du cerveau des rats anesthésiés et éveillés pendant l'absorption du radiotracteur sont statistiquement différentes au niveau du thalamus, du tronc cérébral et du cervelet (test de Student *t* non apparié *p* = 0,0012; 0,0004 et 0,0004, respectivement). Au niveau du noyau caudé, de l'hippocampe et du cortex, le test n'a pas été significatif (*p*> 0,1). La variation des données relatives aux régions disséquées 60 minutes après la mort de l'animal était majeure à celle relative aux régions provenant d'animaux disséqués immédiatement après l'euthanasie (Fig. 19).

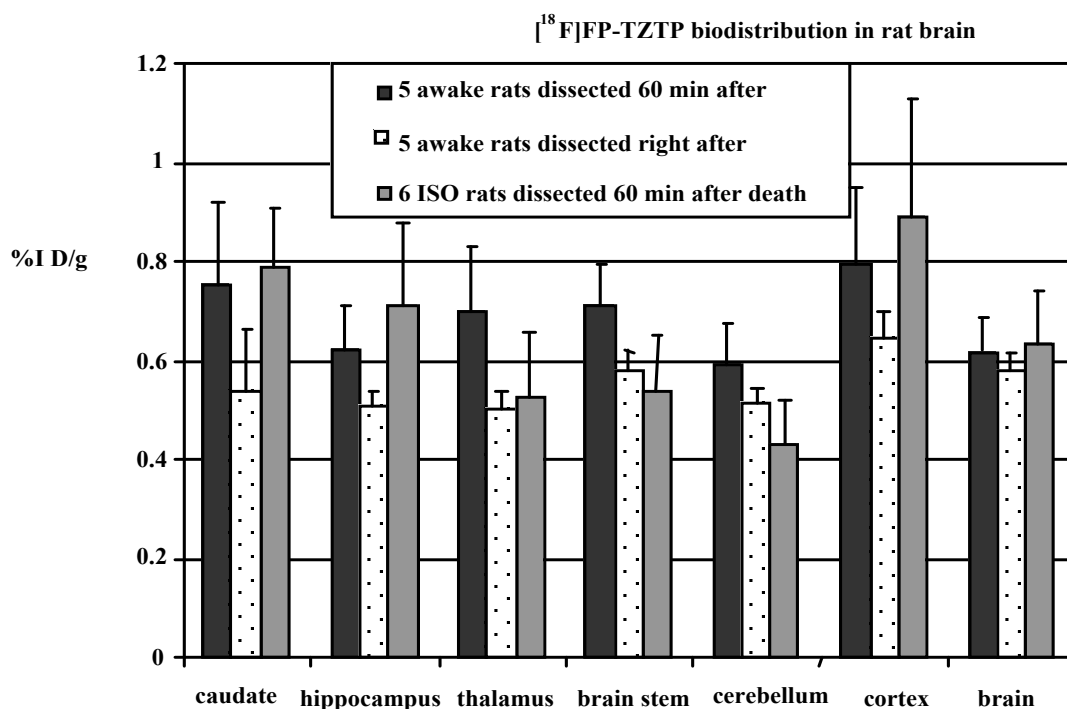


Figure 19. [¹⁸F]FP-TZTP biodistribution data after bolus injection.

Data was obtained by dissection and γ - counting either right away or 60 min after death, expressed as percentage of injected dose per regional body weight (%ID/g), in awake and under isoflurane anesthesia (ISO) rats.

Biodistribution de [¹⁸F]FP-TZTP après injection en bolus.

Les ratios de distribution de [¹⁸F]FP-TZTP ont été calculés par différentes méthodes. Le gold standard voudrait que l'on utilise la fonction d'entrée du plasma, c'est à dire la radioactivité qui est corrélée à la molécule mère injectée. Pour les études en bolus, nous avons substitué le sang au plasma, par conséquent, toutes les fonctions d'entrée en bolus sont basées sur le sang total. L'activité des tissus normalisée à la dose injectée à chaque animal, déterminée par dissection chez les rats éveillés, ne différait pas parmi les six régions analysées et la moyenne était en accord avec la radioactivité détectée avec l'ATLAS (Tab. 10). Chez les rats anesthésiés, il y avait également un bon accord entre la méthode d'imagerie et la dissection, malgré la tendance à avoir des activités plus faibles chez les rats sous isoflurane par rapport aux animaux éveillés. Nous n'avons pas pu détecter d'éventuelles différences régionales dans les ratios de distribution. La variabilité

des régions identifiées par autoradiographie est plus grande lorsque la vraie fonction d'entrée a été utilisée comme dénominateur pour l'activité des tissus au lieu de l'intégrale de l'activité du sang total, à partir de l'injection jusqu'au sacrifice. Cependant, la variabilité des données est réduite de près de moitié chez les rats éveillés par rapport à ceux sous l'isoflurane.

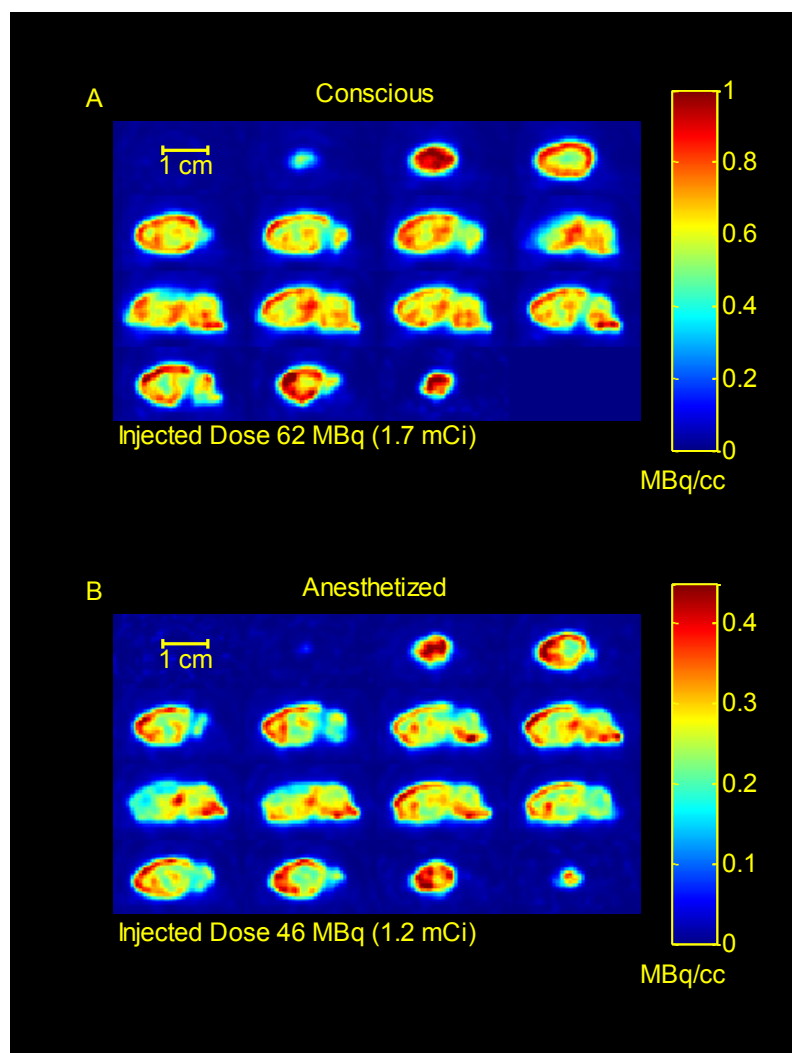


Figure 20. Brain $[^{18}\text{F}]$ FP-TZTP distribution.

$[^{18}\text{F}]$ FP-TZTP distribution in the rat brain viewed sagittally through ATLAS *ex vivo* 15-min scans of conscious (A) and anesthetized rat (B) 30 minutes after a bolus injection of $[^{18}\text{F}]$ FP-TZTP (respectively 62 and 46 MBq).

Biodistribution de $[^{18}\text{F}]$ FP-TZTP au niveau cérébral chez le rat en état d'éveil (A) et sous anesthésie (B) lors de l'injection en bolus.

Table 10. Distribution ratios in Awake and ISO rats after bolus injection of [¹⁸F]FP-TZTP.

Ratios de distribution chez les rats en état d'éveil (Awake) et sous anesthésie (ISO) lors de l'injection en bolus de [¹⁸F]FP-TZTP.

Awake rats	¹ Normalized tissue activity (mL ⁻¹)	² Distribution ratios (mL/mg)	³ Distribution ratios (mL/mg)
Brain regions	Mean ± STD; % coefficient of variation (n=5)		
⁴ whole brain (first 10 min of ex-vivo scan)	7.204 ± 1.474; 20%	101 ± 21; 21%	0.50 ± 0.12 ; 24%
Caudate	9.734 ± 1.668; 17%	140 ± 45; 33%	0.68 ± 0.13; 19%
Hippocampus	8.454 ± 1.616; 19%	120 ± 30; 25%	0.59 ± 0.10; 18%
Thalamus	9.489 ± 2.024; 21%	135 ± 41; 31%	0.65 ± 0.10; 16%
Brain stem	9.517 ± 1.596; 17%	136 ± 34; 26%	0.66 ± 0.12; 18%
Cerebellum	8.006 ± 1.549; 19%	114 ± 30; 26%	0.56 ± 0.11; 20%
Cortex	10.618 ± 2.096; 20%	152 ± 42; 28%	0.74 ± 0.18; 24%
Mean from regions obtained by autoradiography	9.007 ± 1.981; 22%	129 ± 36; 38%	0.6 ± 0.13 ; 23%

ISO rats	¹ Normalized tissue activity (mL ⁻¹)	² Distribution ratios (mL/mg)	³ Distribution ratios (mL/mg)
Brain regions	mean; % coefficient of variation (n=4)		
⁴ whole brain (last 5 min of alive scan)	6.884 ± 1.622 ; 24%	98 ± 66; 68%	0.33 ± 0.018; 5%
⁴ whole brain (first 10 min of ex-vivo scan)	5.238 ± 1.436; 27%	75 ± 49; 67%	0.26 ± 0.054; 21%
Caudate	8.329 ± 1.289; 15%	119 ± 72; 61%	0.42 ± 0.084; 20%
Hippocampus	7.759 ± 1.682; 22%	102 ± 34; 34%	0.40 ± 0.166; 41%
Thalamus	5.287 ± 1.484; 26%	71 ± 31; 44%	0.28 ± 0.146; 52%
brain stem	5.542 ± 0.793; 46%	79 ± 44; 56%	0.28 ± 0.102; 36%
Cerebellum	4.678 ± 0.621; 36%	65 ± 30; 47%	0.24 ± 0.085; 35%
Cortex	10.352 ± 0.932; 48%	148 ± 83; 57%	0.52 ± 0.140; 27%
Mean from regions obtained by autoradiography	6.834 ± 1.503; 22%	96 ± 53 ; 56%	0.35 ± 0.13; 37%

¹Tissue activity, decay corrected at time of injection (kBq/mL) divided by injected dose (kBq).

² Distribution ratios are calculated as tissue activity (kBq/mg) over metabolite-corrected whole blood input function (kBq/mL).

³ Distribution ratios are calculated as tissue activity (kBq/mg) over integral from 0 to 27.5 min of whole blood [¹⁸F]FP-TZTP (kBq/mL).

⁴data from ATLAS imaging.

c) Comparaison entre la fonction d'entrée dérivée du plasma et celle dérivée du sang

Pour la méthode d'injection en bolus, la quantité de sang nécessaire pour obtenir une courbe complète de plasma pour définir le pic est supérieure à ce qu'un rat de 250g peut

perdre en un court laps de temps (<3 minutes). Nous avons donc remplacé la fonction d'entrée plasmatique par celle dérivée du sang afin de réduire de moitié le volume sanguin requis. Toutefois, chez les 5 animaux utilisés pour évaluer si le sang pouvait se substituer au plasma, nous avons remarqué que la relation entre le radiotracer "parent" plasmatique et celui dans le sang n'est pas constante au cours du temps, et ce même en cas d'administration par perfusion constante (Fig. 21). Par conséquent, la fonction d'entrée du sang total ne peut pas se substituer à la fonction d'entrée plasmatique pour les études avec [¹⁸F]FP-TZTP.

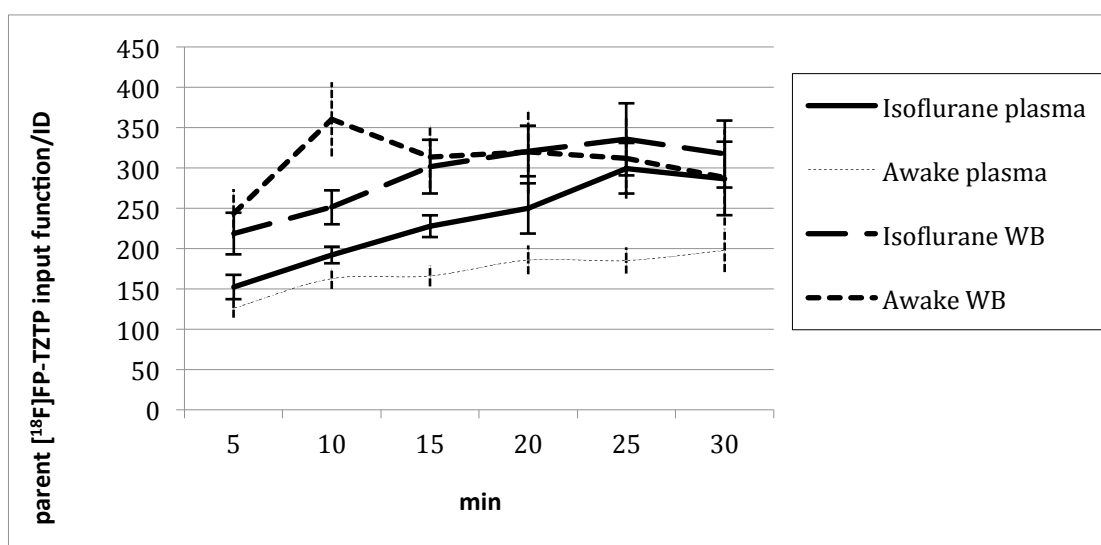


Figure 21. Plasma and whole blood input function from 0 to 30 min in awake and under isoflurane rats while ca. 140 MBq of [¹⁸F]FP-TZTP is infused at 60 μ L/min.

Fonction d'entrée dérivée du plasma et du sang entier entre 0 et 30 minutes chez les rats en état d'éveil et sous anesthésie lors de la perfusion de [¹⁸F]FP-TZTP à 60 μ L/min.

d) Méthode d'administration: perfusion constante

Puisque l'échantillonnage pour les études de perfusion constante était moins fréquent, il a été possible d'obtenir les données plasmatiques corrigées des métabolites. Le pourcentage de [¹⁸F]FP-TZTP dans le plasma après injection était similaire chez les rats éveillés ou sous isoflurane (Tab. 11).

Table 11. [¹⁸F]FP-TZTP as % of total radioactivity in plasma.**[¹⁸F]FP-TZTP en tant que pourcentage de la radioactivité plasmatique totale.**

Time (min)	ISO rats mean ± STD, n=5	Awake rats mean ± STD, n=4
5	39.94 ± 3.28%	40.13 ± 4.38%
10	28.40 ± 2.50%	29.96 ± 2.23%
15	23.05 ± 2.28%	21.44 ± 1.06%
20	19.17 ± 4.53%	18.97 ± 1.99%
25	15.88 ± 4.56%	15.85 ± 1.21%
30	12.65 ± 4.39%	13.90 ± 1.03%

L'activité des tissus a été évaluée à travers la radioactivité détectée par la technique d'autoradiographie (des ROIs ont été placées au niveau de l'hippocampe, l'amygdale, du striatum, du cortex, du thalamus, du tronc cérébral, du cervelet, et du colliculus inférieur et supérieur) et par imagerie ATLAS *in vivo* et *ex vivo* (l'ensemble du cerveau a été considéré comme ROI). Pour les deux méthodes, une ROI de bruit de fond a été soustraite de l'activité des tissus. Les études de dissection n'ont pas été effectuées sur les rats ayant reçu le radiotracer en perfusion constante. Les ratios de distribution de [¹⁸F]FP-TZTP ont été calculés de façon similaire à celles utilisées pour les études par injection en bolus (Tab. 12 et Fig. 22, 23). Les ratios de distribution calculés par la méthode autoradiographique à 30 minutes ne diffèrent pas selon l'état de conscience des rats lors de l'administration, sauf pour le colliculus inférieur ($p=0,0046$; figure 4-4). L'activité des tissus, normalisée par la dose injectée à chaque animal, détectée par la méthode autoradiographique, chez le rat en perfusion constante pendant 30 minutes sous isoflurane, était significativement diminuée au niveau du cervelet par rapport au striatum et au cortex ($p = 0,0007$ et $0,0048$, respectivement). Aucune autre différence statistique n'a été détectée parmi les autres régions, ni lors de la perfusion de 45 ou 120 minutes. Les taux de distribution calculés sur la fonction d'entrée plasmatique ne sont pas significativement différents parmi les régions analysées (Tab. 12).

Table 12. [¹⁸F]FP-TZTP in brain of isoflurane-anesthetized rats at times after start of infusion.

(mean ± STD; coefficient of variation).

[¹⁸F]FP-TZTP au niveau cérébral chez les rats perfusés sous anesthésie à 30, 45 et 120 minutes.

Brain regions	At 30 min		At 45 min		At 120 min	
	¹ Normalized tissue activity (mL ⁻¹) (n=4)	² Distribution ratios (mL/mg) (n=4)	¹ Normalized tissue activity (mL ⁻¹) (n=4)	² Distribution ratios (mL/mg) (n=4)	¹ Normalized tissue activity (mL ⁻¹) (n=3)	² Distribution ratios (mL/mg) (n=3)
Hippocampus	7.805 ± 1.334; 17%	26.2 ± 6.6; 25%	5.192 ± 2.027; 39%	26.5 ± 9.3; 35%	3.277 ± 0.551; 17%	48 ± 7.6; 16%
Amygdala	8.239 ± 0.950; 12%	27.1 ± 5.4; 20%	4.994 ± 1.807; 36%	25.1 ± 7.7; 31%	2.959 ± 0.201; 7%	44 ± 6.1; 14%
Striatum	8.930 ± 0.814; 9%	29.6 ± 4.4; 15%	6.180 ± 2.368; 38%	31.3 ± 10.4; 33%	3.614 ± 0.520; 14%	54 ± 10.4; 19%
Cortex	8.358 ± 1.006; 12%	28.2 ± 4.5; 16%	5.846 ± 2.000; 34%	30.1 ± 9.4; 31%	3.649 ± 0.689; 19%	54 ± 11.5; 21%
Thalamus	7.013 ± 1.207; 17%	23.2 ± 4.9; 21%	4.420 ± 1.992; 45%	22.3 ± 8.9; 40%	2.664 ± 0.806; 30%	40 ± 13.4; 34%
Brain Stem	9.204 ± 1.575; 17%	30.6 ± 6.9; 22%	5.380 ± 2.359; 44%	27.2 ± 10.6; 39%	3.351 ± 0.546; 16%	50 ± 10.3; 21%
Cerebellum	5.856 ± 0.641; 11%	19.5 ± 3.5; 18%	3.373 ± 1.427; 42%	17.1 ± 6.4; 37%	2.068 ± 0.250; 12%	31 ± 4.3; 14%
Inferior colliculus	7.655 ± 1.201; 16%	25.5 ± 5.5; 21%	4.439 ± 1.660; 37%	22.4 ± 7.2; 32%	2.610 ± 0.460; 18%	39 ± 8.1; 21%
Superior colliculus	8.181 ± 1.130; 14%	26.6 ± 5.0; 19%	4.317 ± 1.608; 37%	22.1 ± 6.9; 31%	2.367 ± 0.523; 22%	35 ± 8.8; 25%

¹Tissue activity, decay corrected at time of injection (kBq/mL) divided by injected dose (kBq).

²Distribution ratios are calculated as tissue activity (kBq/mg) over metabolite-corrected plasma input function (kBq/mL).

Distribution ratios of [¹⁸F]FP-TZTP: tissue activity from autoradiography over metabolite corrected plasma input function at 30 min

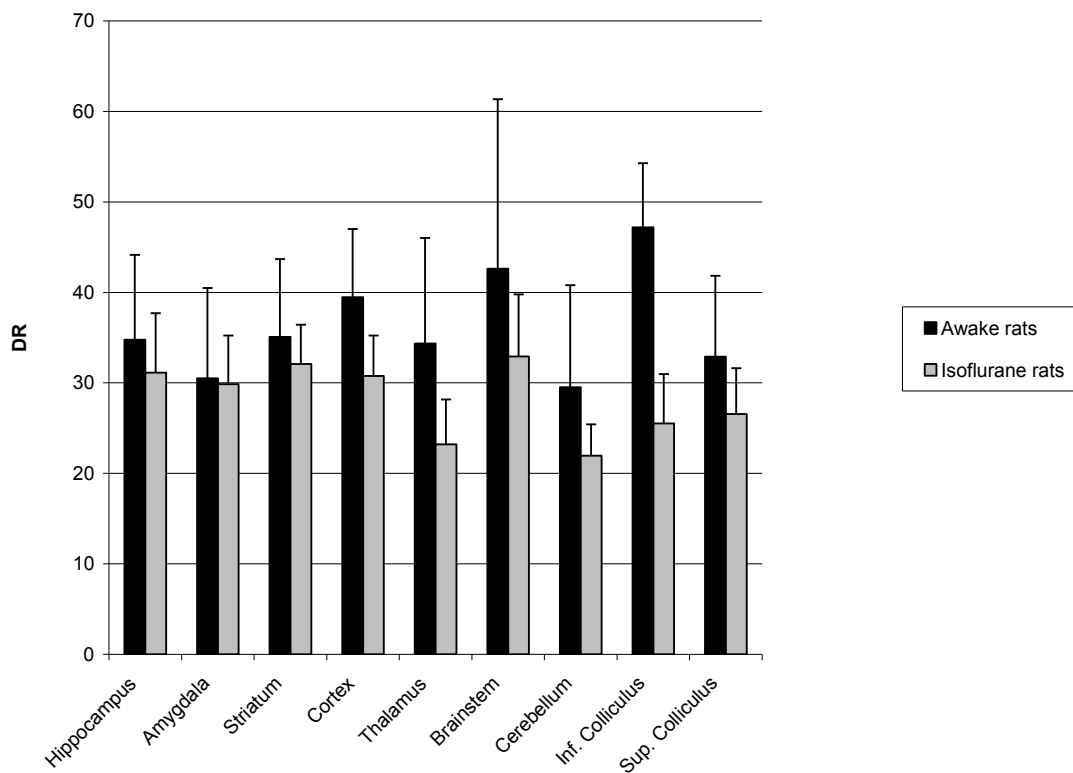


Figure 22. Effect of isoflurane anesthesia on [¹⁸F]FP-TZTP distribution ratios in rat brain.

Data was calculated by the autoradiographic method after the rats received a constant infusion of ca. 140 MBq of [¹⁸F]FP-TZTP for 30 min.

Effet de l'isoflurane sur la distribution cérébrale de [¹⁸F]FP-TZTP chez le rat.

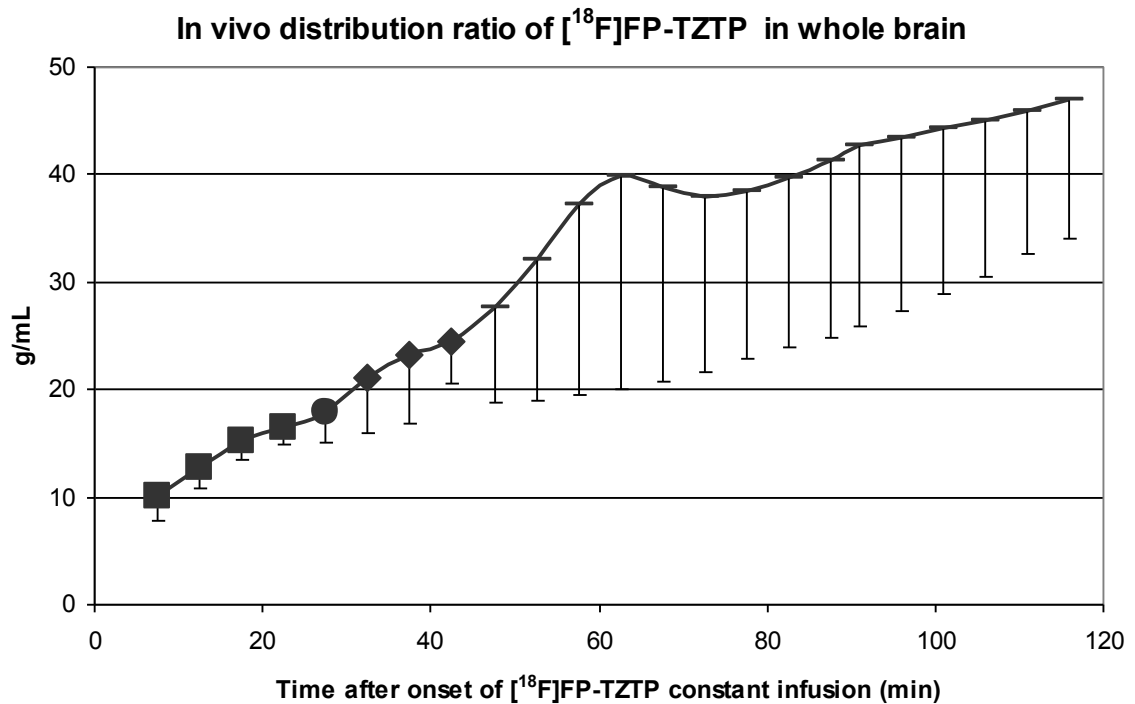


Figure 23. In vivo distribution ratios of $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ in whole brain defined on the ATLAS images over the metabolite corrected radioactivity in plasma over 120 min.

Error bars represent the standard deviation of the averaged distribution ratios of $n=8$ (■), $n=11$ (●), $n=7$ (◆) and $n=3$ (-).

Ratios de distribution de $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ au niveau cérébral calculés à partir des données de l'ATLAS et la fonction d'entrée corrigée plasmatique des métabolites.

Dans les analyses effectuées avec les données provenant de l'ATLAS chez les rats anesthésiés, nous avons calculé les ratios de distribution au cours du temps dans tout le cerveau, considéré comme une seule région (Fig. 23). Nous avons remarqué que l'activité des tissus et la fonction d'entrée continuaient à augmenter après 30 minutes de perfusion constante, ainsi qu'à 45 minutes. Le plateau n'avait pas encore été atteint, même après 120 minutes. La différence en ampleur des barres d'erreur dépend du nombre d'animaux inclus pour chaque point (c'est à dire $n=8$ jusqu'à 25 min, $n=11$, à $t=27$ min; $n=7$ pour $30 < t < 45$ min et $n = 3$ au delà).

La figure 24 montre les images ATLAS du même animal perfusé avec $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ pendant 30 min, *in vivo* (à gauche) et *ex vivo* (à droite).

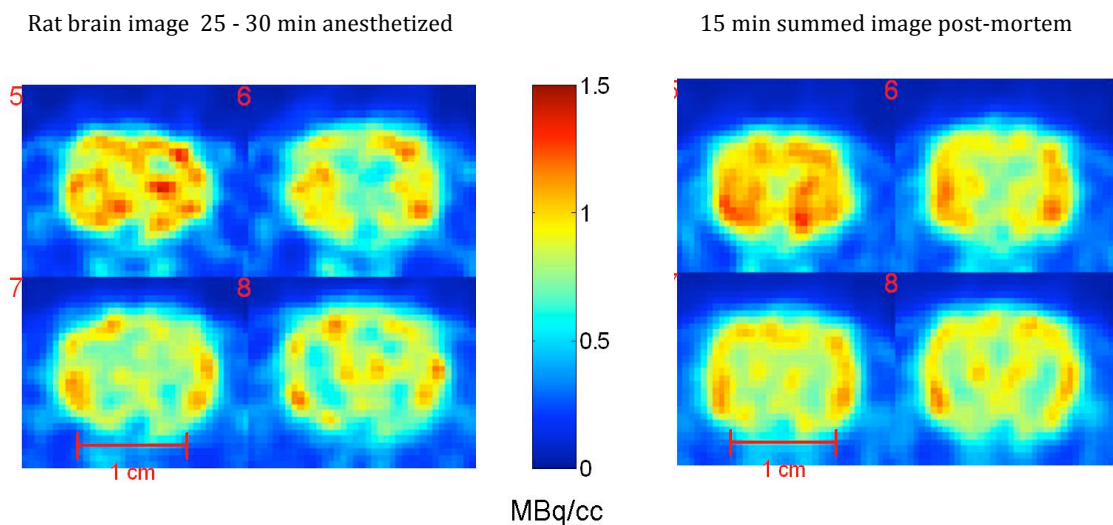


Figure 24. [^{18}F]FP-TZTP distribution illustrated by an ATLAS *in vivo* brain scan of an anesthetized rat from 25 to 30 min (left) and the summed image of 15 min of the *ex vivo* scan (right).

The coronal slices shown are ca. 6-8 mm from the tip of the brain on both scan.

Images ATLAS- ^{18}F]FP-TZTP de distribution cérébrale chez un rat sous anesthésie. A gauche, image dynamique de 25 à 30 min après injection; à droite, image sommée de 15 min après euthanasie.

3.4 Discussion

Le [^{18}F]FP-TZTP est un radiotracer pour le récepteur muscarinique M2 (Jagoda, Kieseewetter et al. 2003). Pour calculer la cinétique de ce traceur chez le rat, nous avons effectué des études *in vivo* et *ex vivo* en utilisant l'ATLAS chez des rats injectés en bolus. Le volume de sang nécessaire par échantillon afin de traiter les métabolites dans le plasma était d'environ 80 μL . Le sang représente environ 8% du poids du corps, donc chez un rat de 200 g, nous avons environ 16 ml de sang total. Physiologiquement, il est acceptable de prélever jusqu'à 10% du sang total, ce qui signifiait pour nos animaux 1,6 ml. En raison de la clairance très rapide de [^{18}F]FP-TZTP (Shimoji, Esaki et al. 2003), plus des deux tiers des échantillons devaient être prélevés dans la première minute, ce qui a causé une baisse significative de l'hématocrite. De plus, la fréquence d'échantillonnage et le volume total prélevé ont affecté les paramètres physiologiques. Par conséquent, nous ne pouvions pas utiliser le plasma comme la fonction d'entrée dans ce cas. Nous avons pensé à utiliser le sang entier pour en extraire les données de la fonction d'entrée. Malheureusement, la

relation entre le "parent" [¹⁸F]FP-TZTP dans le plasma et celui dans le sang total n'est pas constante au fil du temps.

Puisque [¹⁸F]FP-TZTP cible un récepteur, qui est reparti de façon hétérogène dans la matière grise, il est impossible d'utiliser la méthode basée sur la région de référence pour calculer les ratios de distribution. En raison de contraintes de volume sanguin et à l'impossibilité de substituer la fonction d'entrée plasmatique, la méthode d'injection en bolus ne peut pas être utilisée pour obtenir les paramètres cinétiques pour le [¹⁸F]FP-TZTP. Les ratios de distribution calculés à travers la méthode autoradiographique révèle un effet d'anesthésie dans une seule région, le colliculus inférieur (Fig. 22), tandis qu'une tendance plus générale a été observée dans les études de bolus lorsque les taux de distribution ont été calculés sur la fonction d'entrée de sang entier (Tab. 10). Bien que la seule différence significative ait été relevée au niveau du colliculus inférieur, cela voudrait dire que l'isoflurane a un effet croissant sur la libération d'ACh qui rivalise avec le FP-TZTP au niveau du site de liaison aux récepteurs. Ce comportement a également été rapporté par Gomez et al. (Gomez, Gomez et al. 2000).

Dans les études réalisées par perfusion constante, l'activité tissulaire du cervelet est nettement inférieure à celle du cortex et du striatum. Il est possible que le cervelet soit une région plus sensible à l'isoflurane.

La variabilité dans les dosages pouvant obscurcir l'identification des petites différences dues à un traitement pharmacologique, il est souhaitable de choisir le système le plus robuste. Dans ce cas, les études en perfusion produisent les résultats plus précis. Certains chercheurs ont comparé les méthodes d'administration pour déterminer la liaison régionale du (+)-alpha-dihydrotrabéazine (DTBZ) au transporteur vésiculaire des monoamines dans un cerveau de rat (Kilbourn and Sherman 1997). Une variabilité de 30-35% dans les estimations des volumes de distribution pour les régions cérébrales après perfusion de radiotracteur a été rapportée. La normalisation de ces volumes de distribution aux valeurs du cervelet (bien que le cervelet ne soit pas une région de référence) a diminué la variabilité à 10-16%. Une majeure variabilité a également été observée après correction des métabolites. La liaison spécifique cérébrale chez le rat *in*

vivo, de formes radiomarquées de DTBZ et D-thréo-méthylphénidate (MPH), a montré une excellente reproductibilité ($3,62 \pm 0,33$; $n=35$). De même, la liaison striatale de MPH au transporteur de la dopamine (DAT) a montré une reproductibilité similaire sur une période de cinq ans. Ces études soutiennent l'utilisation de ces techniques *in vivo* pour obtenir des mesures fiables de la liaison spécifique des radioligands aux sites à haute affinité dans le cerveau de rat (Kilbourn 2004). Ma et al. (Ma, Sherman et al. 2004) ont comparé les erreurs associées à la dissection, utilisée pendant de nombreuses années, aux études d'imagerie *in vivo*. Le traitement avec un inhibiteur de l'acétylcholinestérase a été évalué chez le rat éveillé et sous isoflurane, en utilisant la dissection *ex vivo* et l'imagerie *in vivo*. L'analyse par dissection *ex vivo* a montré une inhibition de 10%, statistiquement significative, d'un radioligand pour récepteurs muscariniques chez tous les animaux, éveillés et anesthésiés. Cependant, la micro TEP chez les animaux anesthésiés n'a pas réussi à montrer cette inhibition, très probablement à cause de la variation accrue (Ma, Sherman et al. 2004).

La variabilité des résultats de l'extraction des métabolites est un facteur supplémentaire qui nous amène à conclure que ces extractions, chez les rats, ne sont pas aussi fiables que chez les grands animaux (singe ou Homme). En effet, chez les rongeurs, les extractions sont faites à partir de volumes bien plus petits en raison des contraintes du volume sanguin total. Toute inexactitude de pipetage sur des petits volumes provoque des erreurs importantes, ce qui conduit à des erreurs plus grandes dans les pourcentages de métabolites chez les rats plutôt que les grands primates. De plus, Ma et al. (Ma, Kiesewetter et al. 2003) ont observé que le métabolite diméthyle chez l'homme est presque négligeable (<2%) alors que chez le rat, ce métabolite représente >6% aux temps précoces. Les prélèvements d'échantillons sanguins et les extractions ont été réalisés avec des techniques développées au sein de notre laboratoire. Cependant, des instruments avec une meilleure sensibilité sont en voie de développement. Ceci pourrait conduire à de plus petits échantillons et, par conséquent, moins d'effets physiologiques après l'injection de [^{18}F]FP-TZTP en bolus (par exemple, l'accélérateur de spectrométrie de masse (White and Brown 2004) ou la spectrométrie de masse par ionisation de résonance laser (Blaum, Geppert et al. 2002). Néanmoins, en l'attente de nouveaux instruments qui permettent de

récupérer la cinétique complète du FP-TZTP après injection en bolus, la méthode de perfusion conduit à des volumes de distribution, sans interférer sur les paramètres physiologiques. La perfusion peut donc être utilisée pour étudier l'effet d'un traitement pharmacologique sur le système cholinergique.

Une troisième possibilité d'administration du traceur radioactif est le paradigme bolus+perfusion (B+P). Toutefois, Carson et al. (Carson, Kiesewetter et al. 1998) avaient déjà écarté cette combinaison dans une étude chez les singes. En effet, une variabilité trop importante avait été trouvée au niveau du flux sanguin cérébral de l'animal anesthésié. Les auteurs ont suggéré que le paradigme B+P pourrait être une approche chez l'homme, où l'anesthésie pourrait être évitée.

Enfin, une étude récente (Ichise, Cohen et al. 2008) a proposé un moyen d'estimer un volume de distribution normalisé sans avoir besoin de données artérielles dans les cas de traceurs ciblant des récepteurs sans région de référence. Ceci permettrait de calculer les différences de liaison aux récepteurs au niveau des régions cérébrales. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec cette méthode à ceux obtenus à partir de la fonction d'entrée artérielle et les courbes d'activité tissulaire au cours du temps chez les petits animaux.

3.5 Conclusion de l'étude

Chez le rat, quand 1) un traceur se lie à un neurorécepteur entièrement réparti au niveau du cerveau (c'est à dire sans région de référence), et 2) le traceur a un métabolisme et une clairance très rapide, la méthode d'injection en bolus n'est pas une méthode appropriée pour calculer les ratios de distribution, car elle ne permet pas les mesures nécessaires à l'obtention du modèle cinétique complet.

La méthode de perfusion constante est un meilleur paradigme pour obtenir le taux de distribution à condition que l'équilibre entre le tissu et le plasma soit atteint dans un laps de temps raisonnable (avant que les métabolites radioactifs ne traversent la BHE).

A ce jour, les études [^{18}F]FP-TZTP-TEP chez les rats doivent être effectuées en perfusant de façon constante le radiotracteur et en déterminant le ratio de distribution à partir de l'activité plasmatique corrigée des métabolites.

Chapitre III. Discussion

1 Du préclinique à la clinique

Ce travail de recherche sur le FP-TZTP nous a permis de mieux comprendre les caractéristiques de ce traceur. La partie des études *in vitro* nous a donné l'occasion d'explorer les différents sous-types de récepteurs muscariniques, d'approfondir nos connaissances sur leurs similitudes et d'évaluer leurs différences. Nous avons également pu apprécier les difficultés relatives aux traceurs qui ciblent les récepteurs sans qu'il n'existe une région de référence au niveau cérébral, et de ce fait la difficulté d'obtenir des données précises pour élaborer une fonction d'entrée en tenant en considération les contraintes du volume sanguin chez le petit animal.

Certes, ce travail a demandé un investissement considérable en énergie, temps, personnel et également d'un point de vu financier. Mais pourquoi? Les études cliniques en TEP avec [¹⁸F]FP-TZTP sont bien plus simples à gérer donc existe-t-il un réel intérêt pour faire tout ce travail « de fond » en préclinique?

Pourquoi est-ce vraiment important de créer des modèles de maladie chez l'animal (alors que ces maladies sont bien plus réelles, complètes et déjà présentes chez l'Homme)?

Il se peut que la clinique n'apprécie pas le potentiel du préclinique par manque de communication entre les deux mondes, par manque de connaissance de ce qu'il se passe dans l'un vis-à-vis de ce qui se passe dans l'autre, ou bien par manque de capacité à discerner les avantages énormes dont ces deux mondes pourraient bénéficier s'ils étaient plus proches.

2 *Perspectives de recherche*

2.1 *Considérations*

La Maladie d'Alzheimer a été identifiée 1906. En 1984, le NINCDS-ADRDA a mis en place des critères pour la définir. En 2007, ces mêmes critères ont été revus (Dubois, Feldman et al. 2007). Parmi les articles références sur *Pubmed*, la première étude qui emploie MA comme mot clé, apparaît en 1945 (Stern, Hinds et al. 1945). Aujourd'hui, il existe presque 60000 articles relatifs à la MA, dont plus de 12000 revues. Depuis une trentaine d'années, le monde médical et scientifique aussi bien que le monde politique, industriel et pharmaceutique ont pris conscience de l'impact de cette démence sur la société. Les efforts considérables, continus, et certainement constructifs, n'ont pourtant pas encore abouti à une solution médicamenteuse efficace pour traiter la MA, et encore moins à une mesure de prévention de développement de la maladie.

La MA est sans doute une maladie complexe. Or elle est diagnostiquée de façon très simple, en histologie, par la présence des plaques séniles et des DNF. Ne sommes-nous pas en train de chercher au mauvais endroit? Ou plus précisément, au mauvais moment?

Si un patient a une plainte mnésique et quelques dysfonctions exécutives, de l'atrophie hippocampique visible en IRM, un TEP-FDG montrant un hypométabolisme pariéto-temporal, un TEP-PIB positif, un taux du peptide amyloïde A β -42 abaissé et un taux de *tau* et P-*tau* élevé, il sera évidemment étiqueté comme « MA probable ». Cependant, par manque de confirmation histo-pathologique, nous n'avons pas la possibilité de poser un diagnostic de certitude. Mais en avons-nous vraiment besoin ?

L'intérêt de diagnostiquer une maladie chez un patient étant corrélé à la possibilité de soigner ce patient, les critères de définition du diagnostic de MA probable et MA possible ont été revus (Dubois, Feldman et al. 2007).

Cependant, dans le domaine de la recherche, nous avons le devoir de trouver ce qui, en amont, déclenche « ce » que nous retrouvons chez le patient, tels les plaques séniles ou les DNF dans la MA. Les plaques séniles, en particulier, sont en effet visibles chez le patient *in*

vivo grâce à ces traceurs plutôt récents qui ciblent l'amyloïde. Mais une fois les plaques formées, soit quand le patient a un TEP positif pour la présence d'amyloïde, sommes-nous vraiment plus avancés dans le choix des traitements pour ce patient ?

Le monde préclinique se doit de trouver la possibilité d'explorer les systèmes de neurotransmission cérébrale, dont le déséquilibre est très probablement à l'origine d'une cascade d'évènements qui mènent à l'accumulation pathologique du peptide amyloïde A β -42 qui s'agrège et forme les plaques séniles.

Cette étape, « le début du déséquilibre », se situe logiquement dans une phase pré-symptomatique de la MA, mais bien en amont de la variation des taux des peptides et des protéines du LCR, de la mort neuronale et de l'atrophie hippocampique (Fig. 25) (Sperling, Aisen et al. 2011).

Il est donc essentiel de trouver des « outils » précliniques qui puissent évaluer la physiologie de ces systèmes de neurotransmission afin d'apprécier les changements lors d'une situation pathologique (modèle de maladie) ou lors d'une intervention médicamenteuse (effet thérapeutique).

Convaincus de l'utilité du préclinique et de l'importance de sa complémentarité vis-à-vis du monde clinique, nous avons étudié et démontré que le [^{18}F]FP-TZTP, couplé à l'imagerie TEP chez le petit animal, est un outil qui permet d'évaluer globalement le système muscarinique. Le [^{18}F]FP-TZTP est un traceur qui permet d'apprécier les changements au niveau de ce système et peut être considéré comme potentiel biomarqueur pour un diagnostic à un stade très précoce de la MA.

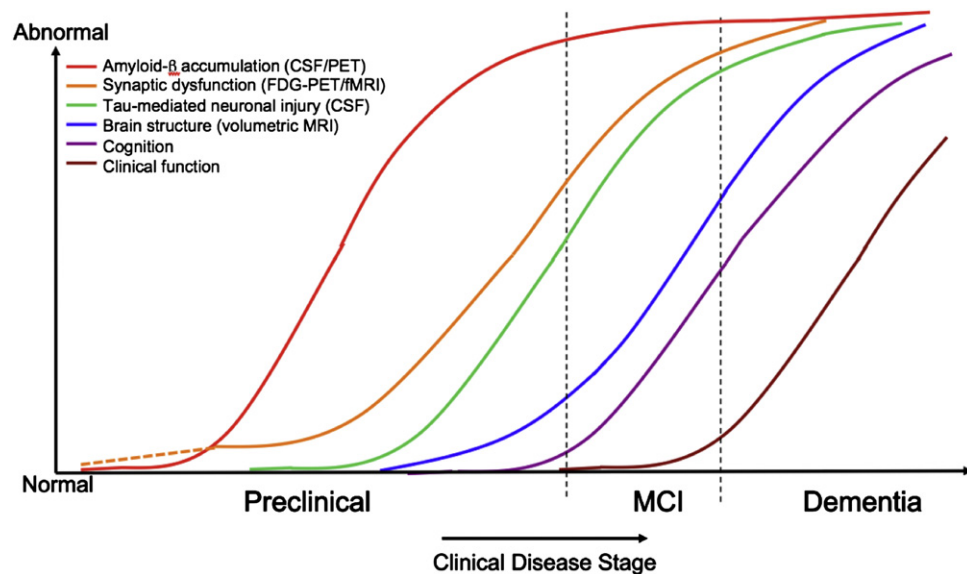


Figure 25. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the AD expanded to explicate the preclinical phase, from Sperling, Aisen et al. 2011.

A β as identified by cerebrospinal fluid A β_{42} assay or PET amyloid imaging. Synaptic dysfunction evidenced by fluorodeoxyglucose (F18) positron emission tomography (FDG-PET) or functional magnetic resonance imaging (fMRI), with a dashed line to indicate that synaptic dysfunction may be detectable in carriers of the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E gene before detectable A β deposition. Neuronal injury is evidenced by cerebrospinal fluid tau or phospho-tau, brain structure is evidenced by structural magnetic resonance imaging. Biomarkers change from normal to maximally abnormal (y-axis) as a function of disease stage (x-axis). The temporal trajectory of two key indicators used to stage the disease clinically, cognitive and behavioral measures, and clinical function are also illustrated.

Modèle hypothétique de biomarqueurs dynamiques pour la MA, extrait de Sperling, Aisen et al. 2011.

De plus, le [^{18}F]FP-TZTP, couplé à l'imagerie TEP chez le petit animal, est un outil qui peut être utilisé pour le dépistage des médicaments vraiment classés « *disease-modifier* ». Cette sélection préclinique, selon l'efficacité thérapeutique, se traduit en un gain économique non négligeable, étant donnés les coûts importants des essais cliniques. D'autre part, cela signifie également un gain de temps considérable pour essayer de compenser la vitesse de croissance de l'impact de la MA sur notre société.

Liste des illustrations

Tables

Table 1. [¹⁸ F]FP-TZTP specific binding internal (SB _i), specific binding external (SB _e), and non-specific binding (NSB) as a percentage of total binding per million M ₁ , M ₂ , M ₃ , M ₄ , or M ₅ -CHO cells.	28
Table 2. B _{max} , K _i , and IC ₅₀ of [¹⁸ F]FP-TZTP and [³ H](+)pentazocine using M ₂ -CHO and WT-CHO cells.	29
Table 3. [¹⁸ F]FP-TZTP off-rates determined <i>in vitro</i> from rat brain slices in 3 independent studies.	31
Table 4. Physiological variables.	44
Table 5. Direct tissue counting vs. PET imaging data.	48
Table 6. Physiological variables of the rats.	58
Table 7. Comparison of sensitivities of ATLAS/PET [¹⁸ F]FDG scanning and [¹⁴ C]DG autoradiography in detection of functional activation in somatosensory cortex by unilateral whisker stimulation in the rat.	59
Table 8. Physiological parameters.	70
Table 9. [¹⁸ F]FP-TZTP as a percentage of total radioactivity in whole blood after a bolus injection in ISO and Awake rats.	71
Table 10. Distribution ratios in Awake and ISO rats after bolus injection of [¹⁸ F]FP-TZTP.	74

Table 11. [^{18}F]FP-TZTP as % of total radioactivity in plasma.76

Table 12. [^{18}F]FP-TZTP in brain of isoflurane-anesthetized rats at times after start of
infusion.77

Figures

Figure 1. Muscarinic receptor agonist from CNSforum.com	7
Figure 2. MRI cortical thickness measurements from Desikan, Cabral et al. 2009	10
Figure 3. PIB and FDG in controls and Alzheimer's disease (AD) from Rabinovici and Jagust, 2009.....	12
Figure 4. Chemical structure of FP-TZTP.....	14
Figure 5. [¹⁸ F]FP-TZTP autoradiography.....	15
Figure 6. Regional brain localization of [¹⁸ F]FP-TZTP in M2 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μCi.....	16
Figure 7. Regional brain localization of [¹⁸ F]FP-TZTP in M1 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μCi.....	17
Figure 8. Regional brain localization of [¹⁸ F]FP-TZTP in M3 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μCi.....	18
Figure 9. Regional brain localization of [¹⁸ F]FP-TZTP in M4 KO compared to WT mice after iv injection of 300 μCi.....	19
Figure 10. [¹⁸ F]FP-TZTP uptake in rat brain tissue slices.	30
Figure 11. Correlation of off-rates with percentage of M ₂ receptors per brain region.	32
Figure 12. Correlation of intercept from dissociation kinetic studies in rat brain with total muscarinic receptor concentration.	32
Figure 13. High-quality PET image of brain of rat that was awake (A) or under isoflurane anesthesia (B) during 45-min period of tracer uptake before scanning.....	45

Figure 14. PET image of average activity during dynamic scanning of anesthetized rat from time of injection of [¹⁸ F]FDG until 60 min later.....	46
Figure 15. Time-activity curves of plasma (left ordinate) and whole brain, CX, TH, CB, and BS (right ordinate) from one animal.....	47
Figure 16. Patlak plot analysis of time-activity curves shown in Fig. 14 for CB, CX, and whole brain.....	49
Figure 17. Timeline of the experimental procedure.....	55
Figure 18. Comparison of [¹⁸ F]FDG ALTAS PET image with the autoradiographic [¹⁴ C]DG image in the same rat.	60
Figure 19. [¹⁸ F]FP-TZTP biodistribution data after bolus injection.....	72
Figure 20. Brain [¹⁸ F]FP-TZTP distribution.....	73
Figure 21. Plasma and whole blood input function from 0 to 30 min in awake and under isoflurane rats while ca. 140 MBq of [¹⁸ F]FP-TZTP is infused at 60 μL/min.	75
Figure 22. Effect of isoflurane anesthesia on [¹⁸ F]FP-TZTP distribution ratios in rat brain.	78
Figure 23. In vivo distribution ratios of [¹⁸ F]FP-TZTP in whole brain defined on the ATLAS images over the metabolite corrected radioactivity in plasma over 120 min.....	79
Figure 24. [¹⁸ F]FP-TZTP distribution illustrated by an ATLAS in vivo brain scan of an anesthetized rat from 25 to 30 min (left) and the summed image of 15 min of the ex-vivo scan (right).....	80
Figure 25. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the AD expanded to explicate the preclinical phase, from Sperling, Aisen et al. 2011.....	88

Liste des principales abréviations

[¹⁴ C]DG:	désoxyglucose marqué au Carbone 14
[¹⁸ F]:	Fluor 18
ACh:	acétylcholine
APP:	amyloid precursor protein
ATLAS:	Advanced Technology Laboratory Animal Scanner
BHE:	barrière hémato-encéphalique
BS:	tronc cérébral
CB:	cervelet
CDL:	démence à corps de Lewy
CHO:	chinese ovarien cell
cps:	coups par seconde
CX:	cortex
DFT:	démence fronto-temporale
DMS:	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DNF:	dégénérescences neurofibrillaires
DS:	démence sémantique
DUR:	dose uptake ratio
Dvas:	démence vasculaire
FDG:	fluorodésoxyglucose
fMRI:	functional magnetic resonance imaging

FP-TZTP:	3 - ((3 - (3-fluoro-propyl) thio) -1,2,5-thiadiazole-4-yl) -1,2,5,6-tétrahydro-1-méthylpyridine
KO:	knock out
LC:	lumped constant
ICBF:	local cerebral blood flow
ICMRglc :	local cerebral metabolic rate of glucose
MA:	maladie d'Alzheimer
MABP:	tension artérielle moyenne
Mr:	masse moléculaire relative
NINCDS-ADRDA:	National Institute of Neurological Disorders and Stroke - Alzheimer Disease and Related Disorders Association
NSB:	liaison non spécifique - <i>Non Specific Binding</i>
OMS:	organisation mondiale de la santé
OPEPS:	office parlementaire d'évaluation des politiques de santé
PaCO ₂ :	tension artérielle partielle de CO ₂
PaO ₂ :	tension artérielle moyenne de O ₂
PBS:	phosphate buffered saline
PET/CT:	positron emission tomography/ computerized tomography
psl:	photoluminescence stimulée
P-tau:	phosphorilated-tau
roi:	région d'intérêt
SB(e):	liaison spécifique externe
SB(i):	liaison spécifique interne
SB:	liaison spécifique - <i>Specific Binding</i>
SDS:	sodium dodecyl sulfate
STD:	standard deviation

tau:	tubulin associated unit
TB:	liaison totale - <i>Total Binding</i>
TEP:	tomographie à émission de positons
TH:	thalamus
WT:	wild type

Bibliographie

- Adachi, K., S. Takahashi, et al. (1994). "Increases in local cerebral blood flow associated with somatosensory activation are not mediated by NO." Am J Physiol **267**(6 Pt 2): H2155-2162.
- Aging working group (1998). "Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group." Neurobiol Aging **19**(2): 109-116.
- Attwell, D. and C. Iadecola (2002). "The neural basis of functional brain imaging signals." Trends Neurosci **25**(12): 621-625.
- Aubert, I., D. M. Araujo, et al. (1992). "Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases." J Neurochem **58**(2): 529-541.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, et al. (1982). "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction." Science **217**(4558): 408-414.
- Blaum, K., C. Geppert, et al. (2002). "Trace determination of gadolinium in biomedical samples by diode laser-based multi-step resonance ionization mass spectrometry." Anal Bioanal Chem **372**(7-8): 759-765.
- Bowen, W. D. (2000). "Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials." Pharm Acta Helv **74**(2-3): 211-218.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.
- Bunemann, M. and M. M. Hosey (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." J Physiol **517** (Pt 1): 5-23.
- Cannon, D. M., R. E. Carson, et al. (2006). "Reduced muscarinic type 2 receptor binding in subjects with bipolar disorder." Arch Gen Psychiatry **63**(7): 741-747.
- Carson, R. E., D. O. Kiesewetter, et al. (1998). "Muscarinic cholinergic receptor measurements with [18F]FP-TZTP: control and competition studies." J Cereb Blood Flow Metab **18**(10): 1130-1142.

- Carson, R. E. "Mathematical modeling and compartmental analysis." in Nuclear Medicine: Diagnosis and Therapy. (1996) J. Harbert, R. Neumann and W. C. Eckelman., 3rd ed. 167-194. New York: Thieme Press.
- Kruger, L., S. Sapkota, and L. Swanson. "Photographic Atlas of the Rat Brain". (1995) New York, NY: Cambridge University Press.
- Cohen, R. M., T. A. Podruchny, et al. (2003). "Higher in vivo muscarinic-2 receptor distribution volumes in aging subjects with an apolipoprotein E-epsilon4 allele." Synapse **49**(3): 150-156.
- Cohen, V. I., B. R. Zeeberg, et al. (1998). "In vivo competition studies of Z-(-,-)-[125I]IQNP against 3-quinuclidinyl 2-(5-bromothieryl)-2-thienylglycolate (BrQNT) demonstrating in vivo m2 muscarinic subtype selectivity for BrQNT." J Mol Neurosci **11**(1): 1-9.
- Coyle, J. T., D. L. Price, et al. (1983). "Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation." Science **219**(4589): 1184-1190.
- DeKosky, S. T. and S. W. Scheff (1990). "Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity." Ann Neurol **27**(5): 457-464.
- Delacourte, A., J. P. David, et al. (1999). "The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease." Neurology **52**(6): 1158-1165.
- Desikan, R. S., H. J. Cabral, et al. (2009). "Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Brain **132**(Pt 8): 2048-2057.
- Dewey, S. L., R. R. MacGregor, et al. (1990). "Mapping muscarinic receptors in human and baboon brain using [N-11C-methyl]-benztropine." Synapse **5**(3): 213-223.
- Disney, A. A. and C. Aoki (2008). "Muscarinic acetylcholine receptors in macaque V1 are most frequently expressed by parvalbumin-immunoreactive neurons." J Comp Neurol **507**(5): 1748-1762.
- Drevets, W. C., J. L. Price, et al. (2008). "Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression." Brain Struct Funct **213**(1-2): 93-118.
- Dubois, B., H. H. Feldman, et al. (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol **6**(8): 734-746.
- Eckelman, W. C. (1995). "Designing a molecular probe for muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) imaging." J Nucl Med **36**(6 Suppl): 5S-7S.

- Eckelman, W. C., R. Eng, et al. (1985). "Use of 3-quinuclidinyl 4-iodobenzilate as a receptor binding radiotracer." *J Nucl Med* **26**(6): 637-642.
- Felder, C. C. (1995). "Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors." *FASEB J* **9**(8): 619-625.
- Ferri, C. P., M. Prince, et al. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." *Lancet* **366**(9503): 2112-2117.
- Flynn, D. D. and D. C. Mash (1993). "Distinct kinetic binding properties of N-[3H]-methylscopolamine afford differential labeling and localization of M1, M2, and M3 muscarinic receptor subtypes in primate brain." *Synapse* **14**(4): 283-296.
- Frey, K. A., R. A. Koeppe, et al. (1992). "In vivo muscarinic cholinergic receptor imaging in human brain with [11C]scopolamine and positron emission tomography." *J Cereb Blood Flow Metab* **12**(1): 147-154.
- Friedland, R. P., T. F. Budinger, et al. (1983). "Regional cerebral metabolic alterations in dementia of the Alzheimer type: positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose." *J Comput Assist Tomogr* **7**(4): 590-598.
- Friedman, J. I. (2004). "Cholinergic targets for cognitive enhancement in schizophrenia: focus on cholinesterase inhibitors and muscarinic agonists." *Psychopharmacology (Berl)* **174**(1): 45-53.
- Frisoni, G. B., N. C. Fox, et al. (2010). "The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* **6**(2): 67-77.
- Gibson, R. E., T. Moody, et al. (1992). "The in vitro dissociation kinetics of (R,R)-[125I]4IQNB is reflected in the in vivo washout of the radioligand from rat brain." *Life Sci* **50**(9): 629-637.
- Gitler, M. S., S. F. Boulay, et al. (1995). "Characterization of in vivo brain muscarinic acetylcholine receptor subtype selectivity by competition studies against (R,S)-[125I]IQNB." *Brain Res* **687**(1-2): 71-78.
- Gomez, R. S., M. V. Gomez, et al. (2000). "The effect of isoflurane on the release of [(3)H]-acetylcholine from rat brain cortical slices." *Brain Res Bull* **52**(4): 263-267.
- Green, L. A., S. S. Gambhir, et al. (1998). "Noninvasive methods for quantitating blood time-activity curves from mouse PET images obtained with fluorine-18-fluorodeoxyglucose." *J Nucl Med* **39**(4): 729-734.
- Green, M. V., J. Seidel, et al. (2001). "High resolution PET, SPECT and projection imaging in small animals." *Comput Med Imaging Graph* **25**(2): 79-86.

- Hawkins, R. A., Y. Choi, et al. (1993). "An animal model for in vivo evaluation of tumor glycolytic rates with positron emission tomography." J Surg Oncol **53**(2): 104-109.
- Herholz, K. and K. Ebmeier (2011). "Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease." Lancet Neurol **10**(7): 667-670.
- Ichise, M., R. M. Cohen, et al. (2008). "Noninvasive estimation of normalized distribution volume: application to the muscarinic-2 ligand [(18)F]FP-TZTP." J Cereb Blood Flow Metab **28**(2): 420-430.
- Imran, M. B., R. Kawashima, et al. (1999). "Parametric mapping of cerebral blood flow deficits in Alzheimer's disease: a SPECT study using HMPAO and image standardization technique." J Nucl Med **40**(2): 244-249.
- Jagoda, E. M., D. O. Kiesewetter, et al. (2003). "Regional brain uptake of the muscarinic ligand, [18F]FP-TZTP, is greatly decreased in M2 receptor knockout mice but not in M1, M3 and M4 receptor knockout mice." Neuropharmacology **44**(5): 653-661.
- Jagust, W., R. Thisted, et al. (2001). "SPECT perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease: a clinical-pathologic study." Neurology **56**(7): 950-956.
- Jay, T. M., M. Jouvett, et al. (1985). "Local cerebral glucose utilization in the free moving mouse: a comparison during two stages of the activity-rest cycle." Brain Res **342**(2): 297-306.
- Johnson, C. A., Seidel, J., et al. (2002). "Exact positioning for OSEM reconstructions on the ATLAS depth-of-interaction small animal scanner". Molecular Imaging and Biology Suppl(4): 1-22.
- Kallinowski, F., A. L. Brownell, et al. (1991). "Combined tissue oxygen tension measurement and positron emission tomography studies on glucose utilization in oncogene-transformed cell line tumour xenografts in nude mice." Br J Radiol **64**(760): 350-359.
- Kiesewetter, D. O., R. E. Carson, et al. (1999). "In vivo muscarinic binding of 3-(alkylthio)-3-thiadiazolyl tetrahydropyridines." Synapse **31**(1): 29-40.
- Kiesewetter, D. O., J. Lee, et al. (1995). "Preparation of 18F-labeled muscarinic agonist with M2 selectivity." J Med Chem **38**(1): 5-8.
- Kiesewetter, D. O., B. K. Vuong, et al. (2003). "The automated radiosynthesis of [18F]FP-TZTP." Nucl Med Biol **30**(1): 73-77.

- Kilbourn, M. and P. Sherman (1997). "In vivo binding of (+)-alpha-[3H]dihydrotetrabenazine to the vesicular monoamine transporter of rat brain: bolus vs. equilibrium studies." *Eur J Pharmacol* **331**(2-3): 161-168.
- Kilbourn, M. R. (2004). "Long-term reproducibility of in vivo measures of specific binding of radioligands in rat brain." *Nucl Med Biol* **31**(5): 591-595.
- Kim, J., P. Herrero, et al. (2006). "Minimally invasive method of determining blood input function from PET images in rodents." *J Nucl Med* **47**(2): 330-336.
- Klunk, W. E., H. Engler, et al. (2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B." *Ann Neurol* **55**(3): 306-319.
- Knopman, D. S., S. T. DeKosky, et al. (2001). "Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." *Neurology* **56**(9): 1143-1153.
- Koepp, R. A., K. A. Frey, et al. (1994). "[11C]tropanyl benzilate-binding to muscarinic cholinergic receptors: methodology and kinetic modeling alternatives." *J Cereb Blood Flow Metab* **14**(1): 85-99.
- Kornblum, H. I., D. M. Araujo, et al. (2000). "In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET)." *Nat Biotechnol* **18**(6): 655-660.
- Lapointe, D., N. Brasseur, et al. (1999). "High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice." *J Nucl Med* **40**(5): 876-882.
- Laruelle, M. (2000). "Imaging synaptic neurotransmission with in vivo binding competition techniques: a critical review." *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(3): 423-451.
- Levey, A. I. (1993). "Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain." *Life Sci* **52**(5-6): 441-448.
- Li, M., R. P. Yasuda, et al. (1991). "Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors." *Mol Pharmacol* **40**(1): 28-35.
- Ma, B., P. S. Sherman, et al. (2004). "Sensitivity of [11C]N-methylpyrrolidiny benzilate ([11C]NMPYB) to endogenous acetylcholine: PET imaging vs tissue sampling methods." *Nucl Med Biol* **31**(4): 393-397.
- Ma, Y., D. O. Kiesewetter, et al. (2002). "Identification of metabolites of fluorine-18-labeled M2 muscarinic receptor agonist, 3-(3-[(3-fluoropropyl)thio]-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-me thylpyridine, produced by human and rat hepatocytes." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **766**(2): 319-329.

- Ma, Y., D. O. Kiesewetter, et al. (2003). "Determination of [18F]FCWAY, [18F]FP-TZTP, and their metabolites in plasma using rapid and efficient liquid-liquid and solid phase extractions." Nucl Med Biol **30**(3): 233-240.
- Maekawa, T., C. Tommasino, et al. (1986). "Local cerebral blood flow and glucose utilization during isoflurane anesthesia in the rat." Anesthesiology **65**(2): 144-151.
- Mash, D. C., D. D. Flynn, et al. (1985). "Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation." Science **228**(4703): 1115-1117.
- Masters, C. L., G. Simms, et al. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-4249.
- Matsuno, K., T. Senda, et al. (1995). "Involvement of sigma 1 receptor in (+)-N-allylnormetazocine-stimulated hippocampal cholinergic functions in rats." Brain Res **690**(2): 200-206.
- Matsumura, A., S. Mizokawa, et al. (2003). "Assessment of microPET performance in analyzing the rat brain under different types of anesthesia: comparison between quantitative data obtained with microPET and ex-vivo autoradiography." NeuroImage (20): 2040-2050.
- McCasland, J. S., G. E. Carvell, et al. (1991). "Functional asymmetries in the rodent barrel cortex." Somatosens Mot Res **8**(2): 111-116.
- McKeith, I. G., C. G. Ballard, et al. (2000). "Prospective validation of consensus criteria for the diagnosis of dementia with Lewy bodies." Neurology **54**(5): 1050-1058.
- Mei, J. and G. W. Pasternak (2001). "Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor." Biochem Pharmacol **62**(3): 349-355.
- Melzer, P., H. Van der Loos, et al. (1985). "A magnetic device to stimulate selected whiskers of freely moving or restrained small rodents: its application in a deoxyglucose study." Brain Res **348**(2): 229-240.
- Minoshima, S., B. Giordani, et al. (1997). "Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease." Ann Neurol **42**(1): 85-94.
- Morrison, J. H. and P. R. Hof (1997). "Life and death of neurons in the aging brain." Science **278**(5337): 412-419.
- Mrzljak, L., A. I. Levey, et al. (1998). "Localization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor protein and mRNA in cortical neurons of the normal and cholinergically deafferented rhesus monkey." J Comp Neurol **390**(1): 112-132.

- Nakao, Y., Y. Itoh, et al. (2001). "Effects of anesthesia on functional activation of cerebral blood flow and metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7593-7598.
- Nikolaus, S., M. Beu, et al. (2004). "The contribution of small animal positron emission tomography to the neurosciences--a critical evaluation." Rev Neurosci **15**(2): 131-156.
- Nordberg, A. (2004). "PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease." Lancet Neurol **3**(9): 519-527.
- Nordberg, A. and A. L. Svensson (1998). "Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology." Drug Saf **19**(6): 465-480.
- O'Brien, J. T., S. Eagger, et al. (1992). "A study of regional cerebral blood flow and cognitive performance in Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **55**(12): 1182-1187.
- Pain, F., L. Besret, et al. (2002). "In vivo quantification of localized neuronal activation and inhibition in the rat brain using a dedicated high temporal-resolution beta +- sensitive microprobe." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10807-10812.
- Patlak, C. S. and R. G. Blasberg (1985). "Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. Generalizations." J Cereb Blood Flow Metab **5**(4): 584-590.
- Patlak, C. S., R. G. Blasberg, et al. (1983). "Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data." J Cereb Blood Flow Metab **3**(1): 1-7.
- Podruchny, T. A., C. Connolly, et al. (2003). "In vivo muscarinic 2 receptor imaging in cognitively normal young and older volunteers." Synapse **48**(1): 39-44.
- Prvulovic, D. and H. Hampel (2011). "Amyloid beta (A β) and phospho-tau (p-tau) as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease." Clin Chem Lab Med **49**(3): 367-374.
- Quirion, R., I. Aubert, et al. (1989). "Muscarinic receptor subtypes in human neurodegenerative disorders: focus on Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **Suppl**: 80-84.
- Rabinovici, G. D. and W. J. Jagust (2009). "Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo." Behav Neurol **21**(1): 117-128.
- Rahkonen, T., U. Eloniemi-Sulkava, et al. (2003). "Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(6): 720-724.

- Rinne, J. O., D. J. Brooks, et al. (2010). "¹¹C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study." Lancet Neurol **9**(4): 363-372.
- Rodriguez-Puertas, R., J. Pascual, et al. (1997). "Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease." Synapse **26**(4): 341-350.
- Sarter, M. and J. P. Bruno (1997). "Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis." Brain Res Brain Res Rev **23**(1-2): 28-46.
- Sauerberg, P., P. H. Olesen, et al. (1992). "Novel functional M1 selective muscarinic agonists. Synthesis and structure-activity relationships of 3-(1,2,5-thiadiazolyl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-methylpyridines." J Med Chem **35**(12): 2274-2283.
- Schmidt, K. C. and C. B. Smith (2005). "Resolution, sensitivity and precision with autoradiography and small animal positron emission tomography: implications for functional brain imaging in animal research." Nucl Med Biol **32**(7): 719-725.
- Scarr, E. (2011). "Muscarinic Receptors: Their Roles in Disorders of the Central Nervous System and Potential as Therapeutic Targets." CNS Neuroscience & Therapeutics 1-11.
- Sergeant, N., S. Bombois, et al. (2003). "Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach." J Neurochem **85**(6): 1581-1591.
- Seidel, J., J. J. Vaquero, et al. (2003). "Resolution Uniformity and Sensitivity of the NIH ATLAS Small Animal PET Scanner: Comparison to Simulated LSO Scanners without Depth-of-Interaction Capability". IEEE Transactions on Nuclear Science **50**(5): 1347-1350.
- Shah, R. S., H. G. Lee, et al. (2008). "Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease." Biomed Pharmacother **62**(4): 199-207.
- Shimoji, K., T. Esaki, et al. (2003). "Inhibition of [¹⁸F]FP-TZTP binding by loading doses of muscarinic agonists P-TZTP or FP-TZTP in vivo is not due to agonist-induced reduction in cerebral blood flow." Synapse **50**(2): 151-163.
- Shimoji, K., L. Ravasi, et al. (2004). "Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with ¹⁸F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling." J Nucl Med **45**(4): 665-672.

- Sokoloff, L. (1977). "Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system." J Neurochem **29**(1): 13-26.
- Sokoloff, L. (1999). "Energetics of functional activation in neural tissues." Neurochem Res **24**(2): 321-329.
- Sokoloff, L., M. Reivich, et al. (1977). "The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat." J Neurochem **28**(5): 897-916.
- Soncrant, T. T., H. W. Holloway, et al. (1988). "Cerebral glucose utilization in rats is not altered by hindlimb restraint or by femoral artery and vein cannulation." J Cereb Blood Flow Metab **8**(5): 720-726.
- Sperling, R. A., P. S. Aisen, et al. (2011). "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 280-292.
- Stern, K., E. G. Hinds, et al. (1945). "Ageing and detoxication; studies in hippuric acid synthesis during psychoses of the involuntal and old age group." Am J Psychiatry **102**: 325-329.
- Su, K. H., J. S. Lee, et al. (2009). "Partial volume correction of the microPET blood input function using ensemble learning independent component analysis." Phys Med Biol **54**(6): 1823-1846.
- van Harten, A. C., M. I. Kester, et al. (2011). "Tau and p-tau as CSF biomarkers in dementia: a meta-analysis." Clin Chem Lab Med **49**(3): 353-366.
- van Koppen, C. J. and B. Kaiser (2003). "Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling." Pharmacol Ther **98**(2): 197-220.
- Varma, A. R., J. S. Snowden, et al. (1999). "Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**(2): 184-188.
- Vera, D. R. and W. C. Eckelman (2001). "Receptor 1980 and Receptor 2000: twenty years of progress in receptor-binding radiotracers." Nucl Med Biol **28**(5): 475-476.
- White, I. N. and K. Brown (2004). "Techniques: the application of accelerator mass spectrometry to pharmacology and toxicology." Trends Pharmacol Sci **25**(8): 442-447.

- Wimo, A., L. Jonsson, et al. (2011). "The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project." Int J Geriatr Psychiatry **26**(8): 825-832.
- Wimo, A., B. Winblad, et al. (2010). "The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009." Alzheimers Dement **6**(2): 98-103.
- Yao, R., J. Seidel, et al. (2000). "Performance characteristics of the 3-D OSEM algorithm in the reconstruction of small animal PET images. Ordered-subsets expectation-maximisation." IEEE Trans Med Imaging **19**(8): 798-804.

Remerciements

Je remercie Franck Semah, à l'origine de cette aventure lilloise.

Je remercie Florence Pasquier et Régis Bordet pour leur soutien continu, à travers leurs connaissances, leurs expériences et leurs conseils.

Je remercie tous mes collègues, sans qui ces travaux de recherche n'auraient pas vu le jour, en particulier William C. Eckelman, Dale Kiesewetter, Larry Szajek, Bik-Kee Voung, Elaine Jagoda, my dear friends Kathy Schmidt and Kazuaky Shimoji, my forever mentor Lou Sokoloff and Giovanni Lucignani who started it all.

Je remercie Florent Auger et Nicolas Durieux pour leur patience quotidienne. Je remercie Siemens pour avoir construit un MicroPET/CT qui, malgré quelques petits défauts, est une excellente machine avec laquelle le plaisir de faire de la recherche est renouvelé chaque jour.

Je remercie également toutes les équipes qui ont inclus l'imagerie du petit animal dans leurs protocoles de recherche et qui viennent suivre les acquisitions et en discuter. L'échange d'idées est fort enrichissant et un très bon point de départ pour améliorer les projets. Et d'autant plus agréable puisque cela a généralement lieu dans la bonne humeur.

Je remercie ceux et celles qui ont participé à la création de ce manuscrit, à partir de sa conception jusqu'à la relecture, en passant par l'editing.

Enfin je tiens à remercier profondément tous ceux qui m'ont été très proches depuis le 29 Juillet 2009, soit ma Famille et mes Amis.

Annexes