



Apport de l'imagerie TEP TSPO dans un modèle d'épilepsie mésio-temporale chez la souris

Duc Loc Nguyen

► To cite this version:

Duc Loc Nguyen. Apport de l'imagerie TEP TSPO dans un modèle d'épilepsie mésio-temporale chez la souris. Imagerie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS393 . tel-01692218

HAL Id: tel-01692218

<https://theses.hal.science/tel-01692218>

Submitted on 24 Jan 2018

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.

Apport de l'imagerie TEP TSPO dans un modèle d'épilepsie mésio-temporale chez la souris

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Paris Sud

École doctorale n°575 : electrical, optical,
bio-physics and engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat : Imagerie et physique médicale

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 24 novembre 2017, par

Duc Loc NGUYEN

Composition du Jury :

Izzie Jacques NAMER
PU-PH, Strasbourg (UMR 7237)

Rapporteur

Sylvie CHALON
Directeur de recherche, Tours (Inserm U930)

Rapporteur

Emmanuelle CANET SOULAS
Professeur, Lyon Sud (Inserm U1060)

Présidente

Sébastien JAN
Chercheur CEA, Paris Sud (UMR 1023)

Directeur de thèse

Viviane BOUILLERET
PU-PH, Paris Sud (UMR 1023)

Encadrante

Raphaël BOISGARD
Chercheur CEA, Paris Sud (UMR 1023)

Encadrant

Philippe CHAUMET-RIFFAUD
PU-PH, Paris Sud (ASN)

Invité

Titre : Apport de l'imagerie TEP TSPO dans un modèle d'épilepsie méso-temporale chez la souris

Mots clés : TSPO, TEP ^{18}F -DPA-714, épilepsie méso-temporale, modèle animal, neuroinflammation

Résumé: Le modèle induit par injection unilatérale intrahippocampique d'acide kaïnique chez la souris présente de grandes analogies avec l'épilepsie méso-temporale (EMT) chez l'homme caractérisée par la période d'épileptogénèse et par une sclérose hippocampique (SH) typique.

De récents travaux *ex vivo* ont révélé l'existence de processus neuroinflammatoires au niveau de la SH chez des patients épileptiques et dans des modèles animaux. La protéine translocatrice de 18kDa (TSPO), la plus étudiée actuellement au moyen de différents traceurs, est considérée comme une cible de référence pour visualiser et quantifier la neuroinflammation.

Ma thèse a donc eu pour objectif de déterminer l'évolution de l'expression de TSPO au cours de la constitution de la SH à l'aide de la Tomographie par émission de positons (TEP) au

^{18}F -DPA-714 dans une étude longitudinale chez ce modèle d'EMT, et à identifier son origine à partir d'analyses d'immunohistofluorescence.

Nous avons démontré la faisabilité de la TEP pour suivre *in vivo* le processus inflammatoire même dans de petites structures cérébrales à la fois par la mesure locale du pourcentage d'activité injectée et par l'estimation du volume de distribution.

Le signal maximum a été observé durant l'épileptogénèse et correspondait aux microglies activées puis il diminuait mais persistait lorsque la SH était bien établie, et était alors principalement lié aux astrocytes activés.

Nos principaux résultats ont permis d'identifier les phases pendant lesquelles de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant différents composants de la neuroinflammation mériteraient d'être étudiés.

Title : Role of TSPO PET imaging in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy

Keywords : TSPO, ^{18}F -DPA-714, mesial temporal lobe epilepsy, animal model, neuroinflammation

Abstract: The model induced by unilateral injection of kainic acid is considered as the best reliable model for the mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) and reproduces the epileptogenesis and the typical hippocampal sclerosis (HS).

Recent *ex vivo* studies have revealed the existence of neuroinflammation in the HS of epileptic patients and animal models. The 18kDa translocator protein (TSPO), which is currently the most widely studied with various radiotracers, is considered as a reference target to visualize and quantify the neuroinflammation.

In that context, my thesis focused on determining the evolution of TSPO during the constitution of HS using ^{18}F -DPA-714 positrons emission tomography (PET) in a longitudinal study in this mouse model, and to

identify its origin from immunohistofluorescence analysis.

We demonstrated the feasibility of PET to monitor *in vivo* the inflammatory process even in small cerebral structures both by the local measurement of the percent injected dose or by the measurement of the volume of distribution.

The peak signal was found during the epileptogenesis and corresponded to activated microglia, and then this signal decreased but persisted after the HS was well established, and mainly originated from activated astrocytes during this period.

Our main results allowed us to identify different phases during which potential anti-epileptic treatment targeting different components of neuroinflammation could be investigated.

Table de matières

Table de matières

Remerciements

Liste des abréviations

Publications/communications

Introduction générale	1
Chapitre I. Imagerie en épilepsie du lobe temporal avec sclérose hippocampique	4
1. Définition de l'épilepsie et de l'épilepsie du lobe temporal avec sclérose hippocampique.	4
1.1. Définitions générales	4
1.2. Epilepsie du lobe temporal (ELT) et épilepsie mésiotemporale (EMT)	7
2. Rôle de l'imagerie cérébrale dans l'EMT	11
2.1. Techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN)	12
2.1.1. L'imagerie de résonance magnétique (IRM)	12
2.1.2. L'imagerie de résonance magnétique fonctionnelle (IRMf)	13
2.1.3. Spectroscopie par RMN	14
2.2. Techniques nucléaires	15
2.2.1. TEMP de perfusion cérébrale (^{99m}Tc-HMPAO ou ^{99m}Tc-ECD)	15
2.2.2. TEP de métabolisme glucidique au ¹⁸F-FDG	18
2.2.3. Vers de nouvelles approches par l'imagerie moléculaire	19
2.2.3.1. En recherche clinique	20
Récepteurs centraux aux benzodiazépines (CBR) (TEP au ¹¹C-flumazénil)	20
Récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR) (TEP TSPO)	21
2.2.3.2. En recherche préclinique	22
Modèle d'épilepsie chez le rat	23
Modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'acide kaïnique (AK) chez la souris	24
Enjeu actuel de recherche préclinique	25
3. Rôle de la neuroinflammation et de ses composants en EMT	26
3.1. Généralités	27
3.2. Neuroinflammation et sclérose hippocampique	31
4. Imagerie de neuroinflammation en épilepsie	35

4.1.	Imagerie de l'activation microgliale.....	35
4.2.	Imagerie de l'activation astrogliale.....	37
4.3.	Imagerie du dysfonctionnement de la BHE et de l'invasion de cellules immunitaires périphériques.....	38
5.	Imagerie de la TSPO en épilepsie.....	40
5.1.	Intérêts et challenges de l'imagerie de la protéine TSPO.....	40
5.2.	Imagerie TEP de la TSPO en recherche clinique.....	43
5.3.	Imagerie TEP de la TSPO en recherche préclinique.....	44
6.	Objectifs de travail.....	48
Chapitre II. Mise au point du protocole d'étude d'imagerie TEP au ¹⁸F-DPA-714 dans un modèle d'épilepsie avec SH chez la souris.		49
1.	Introduction et objectifs.....	49
2.	Protocole d'étude.....	50
2.1.	Protocole d'acquisition d'imagerie TEP au ¹⁸ F-DPA-714.....	50
2.1.1.	Conditions expérimentales.....	50
2.1.2.	Voie d'injection.....	51
2.1.3.	Acquisition dynamique TEP au ¹⁸ F-DPA-714.....	51
2.1.4.	Reconstruction d'images.....	54
2.1.5.	Traitement d'images.....	55
2.2.	Modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'AK chez la souris.....	56
2.2.1.	Protocole d'injection intrahippocampique d'AK chez la souris.....	56
2.2.2.	Choix de l'aiguille pour induire le modèle.....	57
2.2.3.	TEP au ¹⁸ F-DPA-714 chez des souris à 7 jours après injection d'AK ou de sérum physiologique.....	58
2.2.4.	Autoradiographie in vitro au ¹⁸ F-DPA-714.....	58
3.	Résultats.....	59
3.1.	TEP au ¹⁸ F-DPA-714 chez des souris C57Bl6 normales, état basal.....	59
3.2.	Choix de l'aiguille pour induire le modèle.....	62
3.3.	Modèle induit par injection intra hippocampique d'AK avec l'aiguille I.....	62
4.	Discussion.....	65
4.1.	Facteurs influant potentiellement la quantification du ¹⁸ F-DPA-714.....	65
4.1.1.	Conditions expérimentales.....	65
4.1.2.	Voie d'injection.....	67

4.1.3.	Acquisition dynamique de 60 minutes	69
4.1.4.	Reconstruction d'images	71
4.1.5.	Traitement d'images	72
4.2.	Effet mécanique de l'aiguille sur la neuroinflammation	73
5.	Conclusion.....	74

Chapitre III. Apport de l'imagerie de la TSPO dans le suivi de la sclérose hippocampique chez un modèle d'épilepsie mésiotemporale chez la souris

75

1.	Introduction et objectifs	75
2.	Matériels et méthodes	76
2.1.	Modèle d'animal	76
2.2.	Protocole d'étude longitudinale.....	76
2.3.	Acquisition dynamique TEP-CT au ¹⁸ F-DPA-714 et traitement d'images	77
2.4.	Autoradiographie <i>in vitro</i> au ¹⁸ F-DPA-714.....	77
2.5.	Immunohistofluorescence (IHF).....	79
3.	Résultats.....	82
3.1.	Evolution des signaux ¹⁸ F-DPA-714 dans l'étude TEP longitudinale	82
3.2.	Caractérisation par autoradiographie <i>in vitro</i> au ¹⁸ F-DPA-714	88
3.2.1.	Analyse visuelle.....	88
3.2.2.	Analyse semi-quantitative.....	91
3.3.	Caractérisation de la sclérose hippocampique par immunohistofluorescence sur des images mosaïques.....	93
3.3.1.	Evolution des cellules microgliales au cours du temps	93
3.3.2.	Evolution des cellules astrocytaires au cours du temps	98
3.4.	Analyse de colocalisation entre TSPO/microglie et TSPO/astrocyte sur des images à plus fort grossissement au niveau de CA1 et du hile des hippocampes	102
4.	Discussion.....	112
4.1.	Faisabilité de la TEP ¹⁸ F-DPA-714 longitudinale pour suivre la neuroinflammation impliquée dans la constitution de la sclérose hippocampique chez la souris	112
4.1.1.	Différence au temps précoce.....	113
4.1.2.	Différence au temps tardif.....	118
4.2.	Autoradiographie au ¹⁸ F-DPA-714 confirmant le signal TEP TSPO dans la sclérose hippocampique.....	120

4.3. Origine du signal TSPO venant successivement d'une activation initialement microgliales puis astrocytaires.....	122
4.3.1. Epileptogénèse	123
4.3.1.1. Effets néfastes des microglies.....	124
4.3.1.2. Effets protecteurs des microglies.....	125
4.3.2. Ictogénèse	126
4.3.2.1. Phase précoce – rôle de la microglie activée localisée à la couche pyramidale CA1	126
4.3.2.2. Phase tardive – SH établie avec une astrogliose importante à 6 mois après injection d'AK.....	128
5. Conclusion.....	129

Chapitre IV. Quantification de l'expression de la protéine TSPO par modélisation de la TEP dynamique au ¹⁸F-DPA-714 dans un modèle d'EMT chez la souris 130

1. Principe de la modélisation cinétique en TEP et défis en imagerie préclinique.....	130
1.1. Définitions générales.....	130
1.2. Effet de volume partiel (EVP)	134
1.3. Fonction d'entrée (FE)	136
2. Matériels et méthodes	138
2.1. Matériels	138
2.2. Traitement d'image	139
2.3. Analyse des données	140
3. Résultats et discussion	142
3.1. Impact de l'atlas sur la quantification	142
3.2. Précision et robustesse de la méthode de l'extraction de FEDI.....	150
3.3. Quantification de l'expression de la TSPO (V_t) durant l'étude longitudinale en utilisant la méthode de l'extraction de FEDI	153
4. Conclusion.....	156

Conclusions générales et perspectives 157

Bibliographies..... 161

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord la **FCS Campus Paris-Saclay** pour m'avoir permis d'effectuer ce travail grâce à une bourse de thèse dans le cadre **du projet IDEX Paris-Saclay**.

Je tiens à remercier le Docteur **Irène Buvat** pour m'avoir permis d'accomplir mon travail de recherche dans de bonnes conditions expérimentales et dans un contexte scientifique favorable au sein du laboratoire **Imagerie Moléculaire In Vivo (IMIV) UMR 1023 Inserm/CEA/Université Paris Sud – ERL 9218 CNRS**. En particulier, j'exprime toute ma gratitude pour le temps qu'elle a passé à corriger en détail mon manuscrit de thèse. Je la remercie vivement pour l'ensemble de ses corrections qui ont grandement contribué à améliorer la lecture du manuscrit.

Je tiens à remercier le Docteur **Raphaël Boisgard** et le Professeur **Viviane Bouilleret** pour avoir initié ce projet et pour m'avoir accompagné avec enthousiasme au cours de la réalisation de ce travail de recherche. Je leur remercie sincèrement pour la formation de qualité qu'ils m'ont prodigué. Son sens critique a été très utile dans l'approfondissement de ce projet ainsi que le manuscrit de thèse qui a été une véritable aventure scientifique, mais aussi humaine.

Je tiens à remercier avec une attention toute particulière le Docteur **Sébastien Jan** pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour m'avoir encouragé au cours de ces dernières années.

Je tiens à remercier le Docteur **Sylvie Chalon** et le Professeur **Izzie Jacques Namer** d'avoir accepté d'expertiser ce rapport de thèse et d'avoir manifesté tant d'intérêt scientifique sur l'ensemble de ce travail. Merci à ces deux rapporteurs pour leurs commentaires qui ont permis d'améliorer le manuscrit.

Je tiens à remercier le Professeur **Emmanuelle Canet-Soulas** pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier en particulier les Professeurs **Philippe Chaumet-Riffaud** et **Alain Prigent** d'avoir accepté d'assister à ma soutenance de thèse. J'exprime toute ma gratitude pour ce qu'ils ont fait pour initier et soutenir mon projet professionnel en médecine nucléaire et pour m'avoir encouragé tout au long de mon séjour en France.

Ensuite, je tiens à remercier le Docteur **Catriona Wimberley** pour le temps qu'elle a passé à optimiser le protocole expérimental ainsi qu'à développer des méthodes de quantification qui ont largement contribué à l'obtention des résultats de mes travaux. Je tiens à remercier le Docteur **Charles Truillet** pour m'avoir aidé à finaliser ma thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à continuer de développer ce projet.

Je tiens à remercier madame **Brigitte Jouve** pour m'avoir aidé à continuer mon travail de thèse dans des moments particulièrement difficiles.

Je tiens à remercier les Docteurs **Claude Comtat** et **Simon Stute** et monsieur **Benoit Jego** pour m'avoir encouragé dans le moment où je pensais d'arrêter ma thèse ainsi que pour m'apprendre des cultures française et suisse.

Je tiens à remercier madame **Karima Ait Aissa** pour m'avoir supporté tous les papiers administratifs, messieurs **Fabien Caillé**, **Stéphane Demphel** et **Stéphane Le Helleix** pour la synthèse du radiotracer ^{18}F -DPA-714, les Docteurs **Alexandra Winkeler** et **Wadad Saba**, mesdames **Géraldine Pottier** et **Emilie Jaumain** pour m'avoir aidée dans expérimentations animales, messieurs **Vincent Brulon**, **Yoann Fontyn** et **Lionel Kallou** pour m'avoir aidée d'assurer une bonne condition de la machine TEP ainsi que de reconstruire des images et monsieur **Fabien Rastello** pour m'avoir aidé de résoudre tous les problèmes informatiques. Je tiens à remercier également les Docteurs **Fawzi Boumezbeur** et **Sébastien Mériaux** pour m'avoir aidé à acquérir et à traiter des images d'IRM à NeuroSpin.

Enfin, j'exprime toute ma gratitude à mes proches, familles et amis. Merci à vous, **Maman, Papa, ma belle-mère et mes belles-sœurs** pour m'avoir toujours soutenu même à une longue distance. Merci à vous, **Monsieur et Madame Do, Michel et Colette** pour m'avoir soutenu dès les premiers jours en France comme ma famille. Un grand merci à ma chérie pour son soutien inconditionnel, particulièrement dans les décisions les plus difficiles de la vie.

A vous tous merci pour votre soutien !!!!

Liste des abréviations

%ID/cc : pourcentage de Dose Injectée par centimètre cube

AK : Acide Kainique

AF : Analyse Factorielle

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BP : Binding Potentiel

CA : Corne d'Ammon

DG : Gyrus Dentelé

EEG : ElectroEncéphaloGraphie

ELT : Epilepsie du Lobe Temporal

ELT-SH : Epilepsie du Lobe Temporal avec Sclérose Hippocampique

EMT : Epilepsie MésioTemporale

EVT : Effet du Volume Partiel

FEDI : Fonction d'Entrée Dérivée d'Image

IHC/IHF : ImmunoHistoChimie/ImmunoHistoFluorescence

IRM : Imagerie de Résonance Magnétique

IRMf : IRM fonctionnelle

LICE : Ligue Internationale Contre l'Epilepsie

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROI : Région d'Intérêt

SE : Status Epilepticus

SH : Sclérose Hippocampique

SNC : Système Nerveux Central

TAC : Courbe Temps-Activité

TDM : TomoDensitoMétrie aux rayonnements X

TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TSPO/PBR: Protéine translocatrice de 18kDa/ Récepteurs périphériques aux benzodiazépines

V_t : Volume de distribution total

ZE : Zone Epileptogénèse

Publications/communications

Article soumis dans des revues à comité de lecture

D-L. Nguyen, C. Wimberley, C. Truillet, F. Caillé, G. Pottier, R. Boisgard, I. Buvat and V. Bouilleret (2017). *Longitudinal imaging of glial cell activation in mouse mesial temporal lobe epilepsy with TSPO PET to identify the best time windows for targeted therapy. Submitted in Epilepsia.*

Résumés publiés dans des revues à comité de lecture

D-L. Nguyen, C. Wimberley, R. Boisgard, I. Buvat and V. Bouilleret (2016). *PET in vivo imaging of 18kDa TSPO expression in a mouse model of temporal lobe epilepsy using ^{18}F -DPA-714 (abstract). J Nucl Med vol.57 Supplement 2 1806.*

D-L. Nguyen, C. Wimberley, R. Boisgard, I. Buvat and V. Bouilleret (2016). *PET in vivo imaging of 18kDa TSPO expression in a mouse model of temporal lobe epilepsy using ^{18}F -DPA-714 (abstract). Eur J Nucl Med Mol Imaging vol 43 Supplement 1.*

Communication orale

D-L. Nguyen, C. Wimberley, R. Boisgard, I. Buvat and V. Bouilleret (2016). *PET in vivo imaging of 18kDa TSPO expression in a mouse model of temporal lobe epilepsy using ^{18}F -DPA-714, EANM'16 – Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 15-19 October, 2016 in Barcelona, Spain.*

Communications affichées

D-L. Nguyen, C. Wimberley, R. Boisgard, I. Buvat and V. Bouilleret (2016). *PET in vivo imaging of 18kDa TSPO expression in a mouse model of temporal lobe epilepsy using ^{18}F -DPA-714, SNMMI 2016 Annual Meeting, 11-15 June, 2016 in San Diego, California, USA.*

D-L. Nguyen, C. Wimberley, R. Boisgard, I. Buvat and V. Bouilleret (2017). *Validation de l'imagerie TEP ^{18}F -DPA-714 dans un modèle d'épilepsie avec sclérose de l'hippocampe chez la souris, JFMN'17 – 3ème Journée Française de Médecine Nucléaire, 18-21 mai, 2017 à Nantes, France.*

C. Wimberley, **D-L. Nguyen**, V. Bouilleret, A. Reilhac, Y. Fontyn, R. Boisgard and I. Buvat (2016). *Quantification of TSPO Expression Using ^{18}F -DPA-714 in a Mouse Model of Epilepsy: Impact of Image Processing, IEEE 2016 – Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference, 29 Oct – 06 Nov, 2016 in Strasbourg, France.*

C. Wimberley, **D-L. Nguyen**, V. Bouilleret, Y. Fontyn, R. Boisgard and I. Buvat (2017). *Quantification of TSPO expression using ^{18}F -DPA-714 using an image derived input function, IEEE 2017 - Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference, 21-28 October, 2017 in Atlanta, Georgia, USA.*

Introduction générale

L'épilepsie est une affection neurologique chronique qui se caractérise par la répétition des crises épileptiques. **L'épilepsie mésiotemporale (EMT)** est la forme la plus fréquente et la plus étudiée du syndrome d'épilepsie focale dont les crises prennent naissance au sein des structures temporales internes.

L'EMT est caractérisée par une histoire naturelle spécifique qui commence par une agression cérébrale initiale suivie d'une période silencieuse (sans crise) pendant laquelle un processus dit d'**épileptogénèse** transforme du « cerveau sain » en « cerveau épileptique » caractérisé par la réapparition des crises épileptiques récurrentes et spontanées (**ictogénèse**). Ces crises sont **pharmacorésistantes**.

La sclérose hippocampique (SH) est une lésion caractéristique de l'EMT. La SH est caractérisée par une perte neuronale au niveau de la corne d'Ammon, toujours associée à une astrogliose importante. Dans la prise en charge de l'EMT en routine clinique, l'IRM reste la technique de référence pour diagnostiquer la SH. La TEP au ^{18}F -FDG interictale a une haute sensibilité pour localiser la zone épileptogène. Le bilan d'imagerie préopératoire permet de définir la zone responsable des crises à opérer pour obtenir environ 80% de guérisons post-opératoires avec suppression complète des crises.

Cependant, le rôle précis des structures mésio-temporales dans la genèse des crises et la signification physiopathologique de la SH restent des sujets controversés. Des modèles animaux sont précieux pour étudier des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'épileptogénèse et l'ictogénèse dans l'EMT.

De récents travaux *in vitro* et *ex vivo* ont révélé l'existence de **processus**

neuroinflammatoires au niveau de la SH chez des patients épileptiques et dans des modèles animaux. **La protéine TSPO**, la plus étudiée actuellement au moyen de différents traceurs, est considérée comme une cible de référence pour visualiser et quantifier la neuroinflammation.

Chez l'homme, l'imagerie de TSPO peut visualiser la neuroinflammation au niveau de la SH ainsi que dans des zones extrahippocampiques chez des patients atteints d'EMT. En recherche préclinique, l'imagerie de la TSPO a démontré un signal élevé dans l'ensemble du système limbique dans la période d'épileptogénèse mais ce signal revient à l'état basal à la période d'ictogénèse chez des modèles du rat.

Ces modèles du rat reproduisent globalement bien la période d'épileptogénèse mais aucun modèle ne reproduit correctement la répétition de crises spontanées sans généralisation (ictogénèse), ou les lésions neuronales limitées à l'hippocampe, caractéristiques de la SH, retrouvées chez l'homme.

Dans ma thèse, nous avons donc utilisé **le modèle d'EMT chez la souris** induit par injection intrahippocampique d'acide kaïnique (AK). En effet, ce modèle a été validé par plusieurs équipes comme pouvant présenter de grandes analogies avec la pathologie humaine pendant la période d'épileptogénèse et la période d'ictogénèse avec une SH typique et reproductible. La petite taille du cerveau de la souris explique probablement qu'aucune étude d'imagerie n'ait été encore réalisée chez ce modèle malgré son intérêt potentiel.

Ma thèse a donc eu pour principal objectif de déterminer l'évolution de l'expression de TSPO au cours de la constitution de la SH à l'aide de la TEP au ^{18}F -DPA-714 dans une étude longitudinale chez ce modèle d'EMT, et à identifier son origine à partir d'analyses d'immunohistofluorescence.

Le présent document comprend quatre chapitres. Le **chapitre I** est consacré à une introduction bibliographique des concepts utilisés et du cadre scientifique concernant l'imagerie en épilepsie du lobe temporal avec sclérose hippocampique. Ce chapitre se termine par une présentation des objectifs spécifiques de ma thèse. Ensuite, le **chapitre II** présente la mise au point des protocoles d'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714 et d'induction du modèle d'EMT chez la souris. C'est sur cette base que nous avons ensuite réalisé une étude longitudinale pour comprendre le rôle de la neuroinflammation dans la constitution de la sclérose hippocampique présentée dans le **chapitre III**. Enfin, le **chapitre IV** présente les défis spécifiques rencontrés pour la modélisation cinétique associée à la TEP au ^{18}F -DPA-714 ciblant la TSPO chez la souris, et les résultats préliminaires obtenus dans le cadre d'études dédiées à cette modélisation.

Chapitre I. Imagerie en épilepsie du lobe temporal avec sclérose hippocampique

L'épilepsie est une affection neurologique chronique qui se caractérise par la répétition des crises épileptiques. Elle touche entre 1 et 2% de la population mondiale, peu importe son âge, sa race, sa classe sociale ou sa nationalité. L'incidence de l'épilepsie est évaluée dans les pays développés entre 45 et 50 cas pour 100 000 habitants, et est plus importante chez les enfants et chez les personnes âgées (OMS 2017). En France, l'épilepsie est le second trouble neurologique le plus répandu après la migraine, concernant environ 0,7% de la population (Loiseau *et al.* 1990a, Loiseau *et al.* 1990b). Approximativement 60% des patients épileptiques présentent une épilepsie partielle, dont l'origine est le plus souvent localisée dans le lobe temporal. Chez environ 40% des patients adultes avec une épilepsie du lobe temporal, les crises vont persister malgré les différents traitements antiépileptiques disponibles. L'épilepsie constitue donc un vrai problème de santé publique (Kwan & Brodie 2002).

Ce chapitre consacré à un état de l'art bibliographique introduit les concepts utilisés en épilepsie et décrit le rôle de l'imagerie en routine et en recherche. Une présentation générale du processus neuroinflammatoire impliqué en l'épilepsie y figure, ainsi que les techniques d'imagerie ciblant les différentes composantes de ce processus. Le chapitre se termine par un état de l'art concernant l'imagerie de la protéine translocatrice TSPO en épilepsie.

1. Définition de l'épilepsie et de l'épilepsie du lobe temporal avec sclérose hippocampique

1.1. Définitions générales

Le cerveau est le centre de régulation et de communication de l'organisme. Il est constitué de tissu nerveux essentiellement composé de neurones. Ce sont des cellules qui, au moyen de signaux électriques, génèrent les informations conditionnant la plupart des fonctions du corps. Dans les

circuits neuronaux sains, les mécanismes excitateurs et inhibiteurs se contrebalancent en permanence.

La crise épileptique peut survenir dès qu'une agression rompt cet équilibre instable dans un circuit qui échappe alors aux systèmes physiologiques de contrôle. Elle se traduit par un ensemble de symptômes neurologiques (cliniques et électrophysiologiques), soudains, inappropriés et transitoires. Une crise accidentelle et unique ne constitue pas une authentique épilepsie et est considérée comme un symptôme neurologique potentiellement d'une autre affection.

L'état de mal (le status epilepticus) est défini comme une crise épileptique non contrôlée qui persiste assez longtemps, ou qui est répétée assez fréquemment, pour ne pas permettre de récupération entre les épisodes. La durée de 30 min a d'abord été considérée comme un minimum. Une définition plus opérationnelle a réduit la durée seuil à 5 min (Lowenstein *et al.* 1999) afin de permettre une prise en charge rapide des patients en raison de la morbidité associée à cet état clinique.

L'épilepsie correspond à la répétition des crises épileptiques, dont les symptômes varient selon les zones cérébrales atteintes. Les divers symptômes sont classés et regroupés par (i) les caractéristiques des crises (sémiologie clinique et EEG, rythme, facteurs favorisants), (ii) l'état intercritique (symptômes neurologiques et neuropsychologiques, anomalies EEG de veille et de sommeil), (iii) les lésions sous-jacentes (données neuroradiologiques ou anatomiques) et (iv) l'histoire naturelle (âge de début, profil évolutif) pour donner la notion **du syndrome épileptique**. Un syndrome est un état où il existe un ensemble de signes et de symptômes qui vont souvent de pair, mais dont la cause est inconnue. A l'inverse, **une maladie épileptique** est un état qui a une cause connue et est caractérisée par des marqueurs biologiques spécifiques qui témoignent des mécanismes physiopathologiques fondamentaux qui la sous-tendent, et non par son apparence

clinique, EEG ou neuroradiologique. A l'heure actuelle, le nombre d'entités correspondant à cette définition reste limité, mais il augmente rapidement grâce aux progrès des neurosciences et en particulier de la génétique.

Dans un premier temps, les différents syndromes épileptiques ont été classés par la Commission de Classification et de Terminologie de la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie (LICE) en 1989 en deux principaux groupes :

- les **épilepsies généralisées** avec les crises impliquant d'emblée des aires étendues corticales et sous-corticales des deux hémisphères cérébraux.
- les **épilepsies focales** avec les crises prenant naissance dans une portion limitée du cortex d'un hémisphère cérébral.

Les caractéristiques des crises de deux principaux groupes sont résumées dans la **figure I-1-1**.

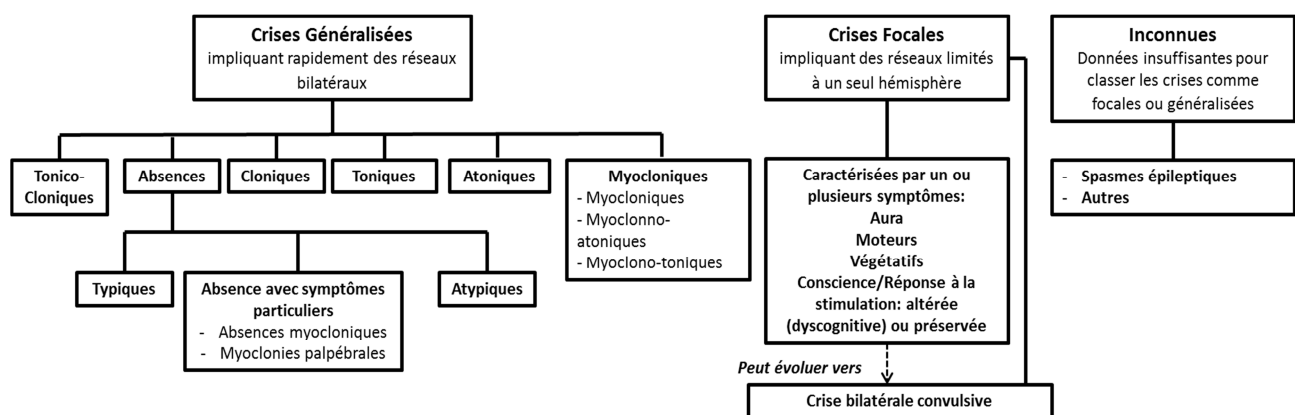


Figure I-1-1. Classification des crises épileptiques (Berg *et al.* 2010).

Les différents syndromes épileptiques sont ainsi subdivisés étiologiquement en **épilepsies idiopathiques** et **épilepsies symptomatiques**. Les épilepsies idiopathiques sont définies comme des atteintes n'ayant pas d'autre cause sous-jacente qu'une prédisposition héréditaire. En revanche, les épilepsies symptomatiques sont caractérisées par une atteinte cérébrale, acquise ou clairement

identifiable, considérée comme la cause de la maladie. Lorsque les épilepsies sont présumées symptomatiques mais que l'étiologie précise n'a pas encore été identifiée, on parle alors d'**épilepsies cryptogéniques**.

L'avancement des technologies d'imagerie a conduit à une révision de la classification par la LICE en 2010. Dans cette nouvelle classification, **les épilepsies focales symptomatiques** sont désormais appelées **épilepsies focales structurelles métaboliques**. Il s'agit soit d'une étiologie structurelle telle que des malformations du développement cortical diffuse ou focale (dysplasie corticale focale), des tumeurs ou des séquelles vasculaires ou post-traumatiques, soit d'une étiologie métabolique telle que des maladies mitochondriales ou des maladies affectant le métabolisme glucidique ou lipidique, soit des deux comme **la sclérose de l'hippocampe**. Ces changements majeurs de la terminologie sont résumés dans la **figure I-1-2**.

Changements majeurs de la terminologie et des concepts		
Nouveau Terme et Concept	Exemples	Ancien Terme et Concept
Etiologie		
Génétique: l'anomalie génétique contribue directement à l'épilepsie et les crises épileptiques sont le principal symptôme de l'affection	Canalopathies, Déficit en GLUT-1, etc...	Idiopathique: présumé génétique
Structurelle-métabolique: en relation avec une anomalie structurelle ou métabolique du cerveau	Sclérose tubéreuse, malformations corticales, etc...	Symptomatique: secondaire à une anomalie ou lésion connue du cerveau
Inconnue: la cause est inconnue et peut être génétique, structurelle ou métabolique		Cryptogénique: présumé symptomatique
Terminologie		
Termes qui ne sont plus recommandés		
Auto-Limité: tendance à se résoudre spontanément avec le temps	Benigne Catastrophique	
Pharmacosensible: probabilité élevée d'être contrôlée par le traitement		
Crises Focales: décrites par les symptômes subjectifs (aura), moteurs, végétatifs et dyscognitifs	Partielle Complexe Partielle Simple	
Evoluant vers une crise convulsive bilatérale: p.ex tonique, clonique, tonico-clonique	Secondairement généralisée	

Figure I-1-2. Changements majeurs de la terminologie et des concepts (Berg *et al.* 2010).

1.2. Épilepsie du lobe temporal (ELT) et épilepsie mésiotemporale (EMT)

L'**épilepsie du lobe temporal (ELT)** fait partie des formes les plus fréquemment diagnostiquées chez l'adulte. Elle est classée comme un syndrome d'épilepsie focale dont les crises prennent naissance au sein des structures temporales, certaines étant néocorticales, d'autres naissant

au niveau de l'hippocampe. Quand ce dernier présente un aspect lésionnel caractéristique, il s'agit d'une **épilepsie mésiotemporale (EMT)**. C'est la forme la plus fréquente et la mieux étudiée des épilepsies temporales.

Epidémiologie. Dans la mesure où ce syndrome n'a été individualisé précisément que récemment, et que seules les formes chirurgicales pharmacorésistantes sont recensées, les données épidémiologiques restent limitées. Elles ne reposent actuellement que sur une approximation. Dans le bilan préopératoire chez les patients d'ELT pharmacorésistantes, 70% ont une atrophie hippocampique détectée à l'IRM (Bernasconi 2006). Chez les patients opérés, 70% ont également une sclérose hippocampique (de Lanerolle *et al.* 1992). Ainsi, l'EMT constitue probablement la plus grande partie de l'ELT.

Histoire naturelle spécifique. Environ 70 à 80% des patients présentant une EMT ont une histoire clinique similaire, débutant dans la première enfance ou rarement plus tardivement (80% des cas avant 4 ans, 20% des cas après 4 ans) par la survenue d'un épisode aigu initial jouant le rôle de facteur déclenchant. Ces agressions peuvent être des états de mal épileptiques, des traumatismes crâniens, des épisodes infectieux sans crise, des troubles métaboliques, des souffrances anoxiques ou ischémiques, etc (Cendes *et al.* 1993).

L'événement déclenchant est suivi par une période de latence, dite silencieuse, qui dure plusieurs années. Durant cette période, même silencieuse, un processus dit d'**épileptogenèse** transforme le « cerveau sain » en « cerveau épileptique » caractérisé par la réapparition des crises épileptiques récurrentes et spontanées (**ictogenèse**). Les premières crises typiques apparaissent classiquement vers la fin de la première décennie. Dans un premier temps, elles peuvent être contrôlées par les médicaments antiépileptiques classiques, mais un échappement se produit après quelques années, à l'adolescence, ou parfois au début de l'âge adulte. Les crises deviennent alors réfractaires aux thérapeutiques pharmacologiques (Engel 1997b).

Crises caractéristiques (Engel 1997a). Elles sont **focales**, et les crises secondairement généralisées sont peu fréquentes. Elles sont fréquemment précédées par **les auras** : sensation épigastrique ascendante, avec souvent des symptômes autonomes, psychiques ou émotionnels (peur), et des sensations olfactives ou gustatives durant plusieurs secondes. Ensuite, les crises débutent par un arrêt de l'activité en cours avec fixité du regard, automatismes oroalimentaires ou complexes et prise de posture controlatérale à la décharge pendant 1 à 2 minutes. Les crises sont suivies d'un dysfonctionnement postcritique souvent prolongé, associant confusion, désorientation, troubles mnésiques et parfois troubles aphasiques.

Signes EEG. Les anomalies **intercritiques** (entre des crises) sont évocatrices avec des pointes temporales antérieures unilatérales ou bilatérales indépendantes. Elles présentent d'éventuelles activités lentes temporales continues ou intermittentes. L'aspect EEG **critique** le plus typique au cours des crises consiste en une activité thêta rythmique de 5 à 7c/s, d'amplitude maximale dans les dérivations temporo-basales (Engel 1997a).

Profils neuropsychologique et psychiatrique. Les patients chez qui l'EMT évolue depuis des dizaines d'années présentent certains troubles de la personnalité et du comportement (irritabilité, intolérance au stress, hypergraphisme, hyposexualité, altération de la perception de soi, etc.) Dépressions et psychoses schizoïdes ont été rapportées (Engel 1997b).

Sclérose hippocampique (SH). La SH correspond à l'aspect lésionnel typique de l'EMT qui se caractérise par une perte sévère des cellules pyramidales et une gliose réactionnelle (Blumcke *et al.* 2013) (**Figure I-1-3**). Cette lésion est unilatérale dans 80% des cas et sera décrite en détail dans la **partie 3.2** de ce chapitre, concernant la neuroinflammation et la sclérose hippocampique.

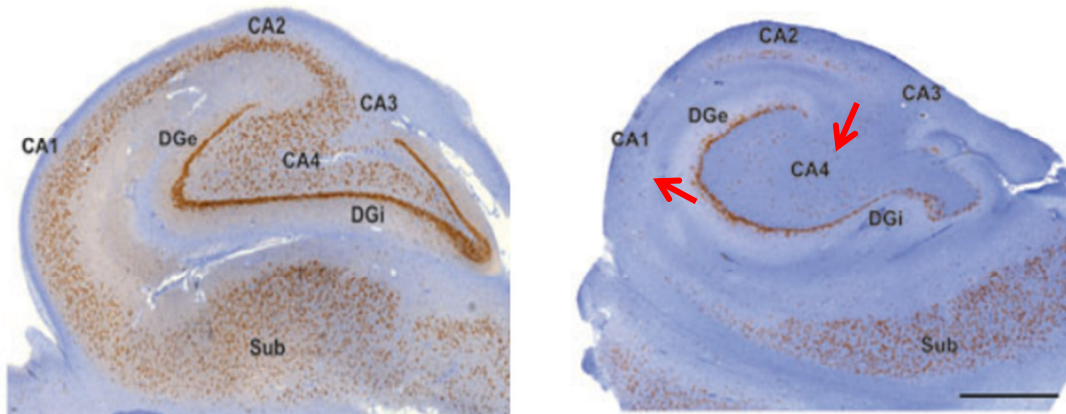


Figure I-1-3. Illustration d'un hippocampe normal et d'un hippocampe sclérotique (Blumcke *et al.* 2013). A droite, l'image montre une sclérose hippocampique typique avec une perte neuronale importante, prédominante au niveau de la couche CA4 et CA1 (flèches rouges), par rapport à un hippocampe normal à gauche. Immunohistochimie avec antiNeuN (signal neuronal) et la contre-coloration avec crésyl violet.

Imagerie. L'IRM est certainement à l'heure actuelle l'examen morphologique le plus sensible et le plus spécifique pour visualiser une sclérose hippocampique. La TEP au FDG apparaît comme la méthode d'imagerie fonctionnelle la plus sensible pour délimiter la **zone épileptogène (ZE)** en dehors des crises. Le rôle de l'imagerie dans l'EMT sera décrit en détail dans la partie suivante (**partie 2**) de ce chapitre.

En résumé, ce travail de thèse s'intéresse plus précisément à **l'épilepsie mésiotemporale (EMT)**, la forme particulière la plus fréquente d'épilepsie focale dont la place est illustrée dans la **figure I-1-4**.

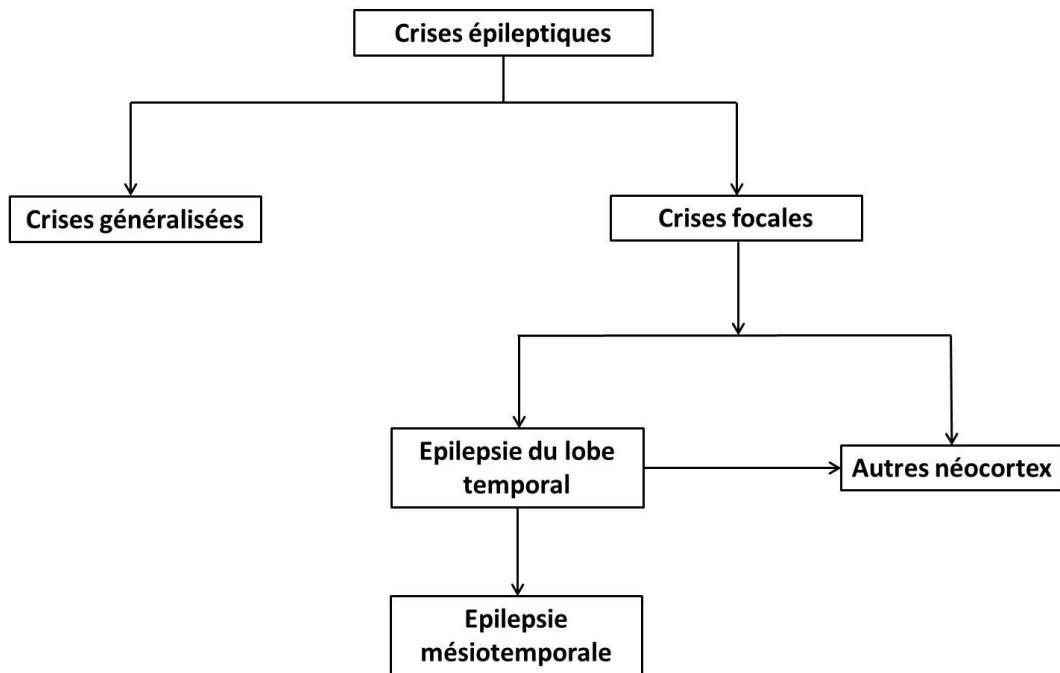


Figure I-1-4. Place de l'épilepsie mésiotemporale dans les syndromes épileptiques.

2. Rôle de l'imagerie cérébrale dans l'EMT

En dehors de l'EEG, les méthodes modernes d'imagerie cérébrale ont un impact important dans le diagnostic et la décision thérapeutique chez des patients atteints d'épilepsies. De nombreuses données anatomiques et fonctionnelles peuvent être actuellement obtenues au moyen de différentes techniques d'imagerie cérébrale. Ainsi, les cas dits *idiopathiques*, qui représentaient 76% des cas entre les années 1940 et 1980 (la période sans imagerie IRM) liés à une forte sous-estimation des causes, sont maintenant fréquemment reclassés comme étiologiques.

Les techniques d'imagerie cérébrale dans l'EMT en routine clinique peuvent se diviser en deux groupes principaux : techniques de résonance magnétique nucléaire dont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est la technique de choix pour la détection de la SH (Cendes *et al.* 2016) et techniques nucléaires parmi lesquelles la tomographie par émission de positons au ^{18}F FDG est une des méthodes complémentaires à l'imagerie morphologique permettant de localiser la ZE dans le bilan préopératoire. Les techniques nucléaires, dites d'imagerie moléculaire, jouent un rôle important dans les recherches cliniques et translationnelles (Goffin *et al.* 2008).

2.1. Techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN)

2.1.1. L'imagerie de résonance magnétique (IRM)

Principes de formation d'une image en IRM. Elle consiste à observer les tissus biologiques grâce aux propriétés magnétiques de l'un de leurs constituants majoritaires, le noyau d'hydrogène.

Le principe général est de placer ces noyaux d'hydrogènes (patients) dans un champ magnétique (tunnel aimant) : ceci induit une aimantation macroscopique. L'excitation de ces noyaux par une onde électromagnétique de fréquence appropriée fait basculer cette aimantation qui se met alors à tourner et à émettre elle-même une onde électromagnétique en retournant à l'état d'équilibre: c'est le signal RMN qu'on peut alors enregistrer.

L'IRM est obtenue à partir d'un enregistrement des signaux RMN dans différents plans orthogonaux avec contrastes différents dépendant des séquences d'acquisition utilisées.

Plan anatomique. Les coupes coronales sont obligatoires et correspondent au plan perpendiculaire au grand axe de l'hippocampe, plan identifié par une image sagittale de repérage (scout image) pour visualiser l'intégralité du lobe temporal et les informations amygdalohippocampiques. L'épaisseur de coupe doit être fine (idéalement inférieur à 3mm) pour visualiser différentes portions de l'anatomie hippocampique.

Séquence d'acquisition. La séquence pondérée en T1, notamment avec inversion-récupération, est recommandée pour évaluer le volume, la forme et la partie interne de l'hippocampe. La séquence pondérée en T2 ou la séquence FLAIR (suppression du signal des liquides) est utilisée pour accéder à l'intensité du signal.

De nombreuses études ont montré que l'IRM est actuellement l'examen le plus sensible et le plus spécifique pour détecter une SH (Cascino *et al.* 1991), (Duncan 1997), (Cendes *et al.* 2016). Classiquement, la SH se définit comme une atrophie sur les coupes pondérées en T1, une diminution de l'intensité du signal et une désorganisation de la partie interne de l'hippocampe en

mode inversion-récupération et une augmentation de l'intensité du signal sur les coupes pondérées en T2 ou FLAIR (**figure I-2-1**). L'IRM peut ainsi distinguer pratiquement l'ELT en EMT et épilepsie extrahippocampique.

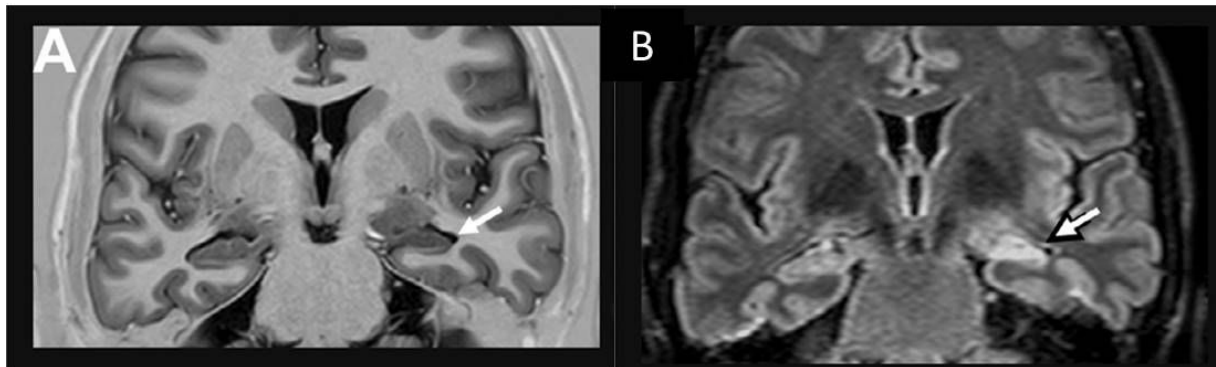


Figure I-2-1. IRM d'une SH gauche avec atrophie et désorganisation interne (flèche) en pondération T1 avec inversion-récupération (A) et hypersignal (flèche) en FLAIR (B) (Cendes *et al.* 2016).

L'analyse visuelle par un œil entraîné est suffisante dans les cas où l'asymétrie interhippocampique atteint au moins 20% (Labate *et al.* 2010). En deçà, seule la quantification par mesures volumétriques peut identifier l'anomalie. Des mesures de temps de relaxation T2 contribuent également à une augmentation de la sensibilité et de la spécificité dans la détection de la SH (Coan *et al.* 2014).

2.1.2. L'imagerie de résonance magnétique fonctionnelle (IRMf)

L'IRMf est obtenue à partir d'une séquence d'acquisition particulière (BOLD : Blood Oxygen Level Dependent) qui est fondée sur l'observation en temps réel des variations de l'oxygénation du sang et des débits sanguins. Les modifications de signal observées sont dues aux variations du rapport de la concentration oxyhémoglobine/désoxyhémoglobine dont les propriétés magnétiques sont différentes. Dans les zones en activité, les augmentations locales de débit sanguin

cérébral font plus que compenser la consommation d'oxygène et se traduisent par une augmentation locale de l'oxygénation du sang résultant en une augmentation locale du signal IRM.

L'IRMf n'est pas encore actuellement approuvée comme indication en routine clinique (Commission on Diagnostic Strategies: recommendations for functional neuroimaging of persons with epilepsy, 2000). Cependant, cette situation évolue et dans de nombreux centres de chirurgie de l'épilepsie, l'IRMf est utilisée pour déterminer des zones fonctionnelles telles que des cortex verbaux, moteurs ou visuels qui doivent être identifiées afin d'être préservées avant la chirurgie (Panayiotopoulos 2005).

2.1.3. Spectroscopie par RMN

La spectroscopie par RMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Les applications les plus importantes en EMT sont la RMN du proton des principaux pics de métabolites (en dehors du proton de l'hydrogène) présents dans le parenchyme cérébral comme le N-acétyl-aspartate (NAA) (marqueur de l'intégrité neuronale), la choline (marqueur de gliose) et la créatine (Cr).

La RMN du proton joue un rôle dans la latéralisation de la ZE dans l'EMT dont des anomalies hippocampiques sont bilatérales. Elle peut mettre en évidence une diminution locale de l'intensité du pic de NAA et des ratios NAA/Choline, NAA/Cr (Cendes *et al.* 2016) dans la ZE en raison de la mort neuronale et de la réaction gliale. L'atteinte hippocampique contralatérale, lorsqu'elle est moins significative que celle ipsilatérale, est alors interprétée comme le témoin fonctionnel de la propagation des crises et se normalise en général en cas de guérison chirurgicale (Ende *et al.* 1997).

Cependant, le rapport signal/bruit relativement faible, le temps d'acquisition long, et l'apport diagnostique moins démonstratif que l'imagerie limitent son application en routine clinique.

2.2. Techniques nucléaires

Les techniques d'imageries nucléaires permettent d'obtenir une cartographie tridimensionnelle *in vivo* d'un processus physiologique à l'aide d'un radiotraceur spécifique émettant des rayonnements γ (tomographie par émission monophotonique (TEMP)) ou des positons (tomographie par émission de positons (TEP)). Elles ont de grands avantages en termes de la sensibilité et de quantification des signaux détectés mais sont limitées en résolution spatiale (5 à 12 mm de résolution spatiale en fonction des techniques).

Cette partie décrit d'abord la TEMP de perfusion cérébrale et la TEP du métabolisme glucidique dans le bilan préopératoire d'EMT en routine clinique. Ensuite, elle introduit d'autres radiotraceurs utilisés en recherches cliniques et translationnelles.

2.2.1. TEMP de perfusion cérébrale (^{99m}Tc -HMPAO ou ^{99m}Tc -ECD)

Le technétium ^{99m}Tc est un radionucléide très utilisé en médecine nucléaire grâce à ses caractéristiques physiques favorables pour l'imagerie. Sa demi-vie est de 6 heures, relativement longue, permettant d'acquérir des images plusieurs heures après injection du traceur. La résolution spatiale de la TEMP varie de 8 à 12 mm.

L'examen est réalisé au cours d'un monitoring vidéo par électroencéphalographie (EEG) afin de pouvoir injecter l'HMPAO (Hexa-Méthyl-Propylène-Amine-Oxime) ou l'ECD (Ethyl-Cystéinate-Dimère) marqués au ^{99m}Tc le plus tôt possible au cours de la crise. L'acquisition peut être réalisée dans un délai de deux heures mais les images reflètent toujours la perfusion cérébrale régionale au moment de l'injection parce qu'une fois injecté, le traceur capté par les cellules

cérébrales reste piégé dès les dix premières secondes. Ainsi, cet examen est appelé **l'examen ictal** (au cours de la crise) et doit être distingué d'un autre examen dit **l'examen interictal** réalisé dans un autre temps en dehors de la crise.

Le but principal de la TEMP ictale est de localiser le point de départ de la crise d'épilepsie, qui est approximativement confondu avec la ZE. C'est la seule méthode d'imagerie pouvant refléter des activités critiques. La TEMP ictale est particulièrement performante puisqu'elle permet de localiser la ZE avec une sensibilité de 75 à 97% et une spécificité de 71 à 100%. Elle doit toujours être comparée à un examen interictal (**figure I-2-2**). Un examen interictal seul n'est pas recommandé parce qu'il est moins sensible que la TEP au ^{18}F -FDG (Spencer 1994).

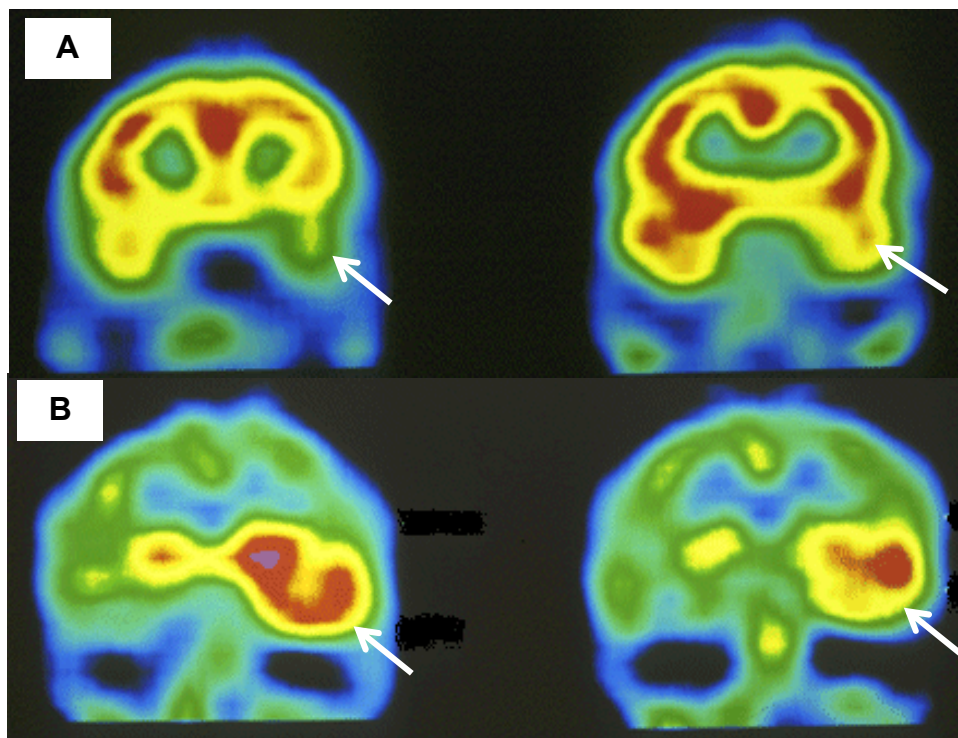


Figure I-2-2. TEMP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD de perfusion cérébrale : des flèches montrent l'hypoperfusion temporelle gauche interictale (A) faisant place à une hyperperfusion ictale (B) dans les zones activées par la crise (Bouilleret 2003).

La soustraction de la TEMP interictale à la TEMP ictale avec recalage sur une IRM en 3 dimensions (**figure I-2-3**) augmente la sensibilité et la spécificité de localisation de la ZE de cet examen.

En pratique, la TEMP peut sembler simple, facilement accessible dans de nombreux hôpitaux et de prix modéré par rapport à la TEP. Ceci est vrai pour la TEMP interictale mais se complique pour la TEMP ictale en raison d'une hospitalisation du patient, et de la nécessaire surveillance rapprochée sous contrôle vidéo-EEG. Ainsi le coût indirect de la TEMP ictale en temps, personnels et frais d'hospitalisation est loin d'être négligeable.

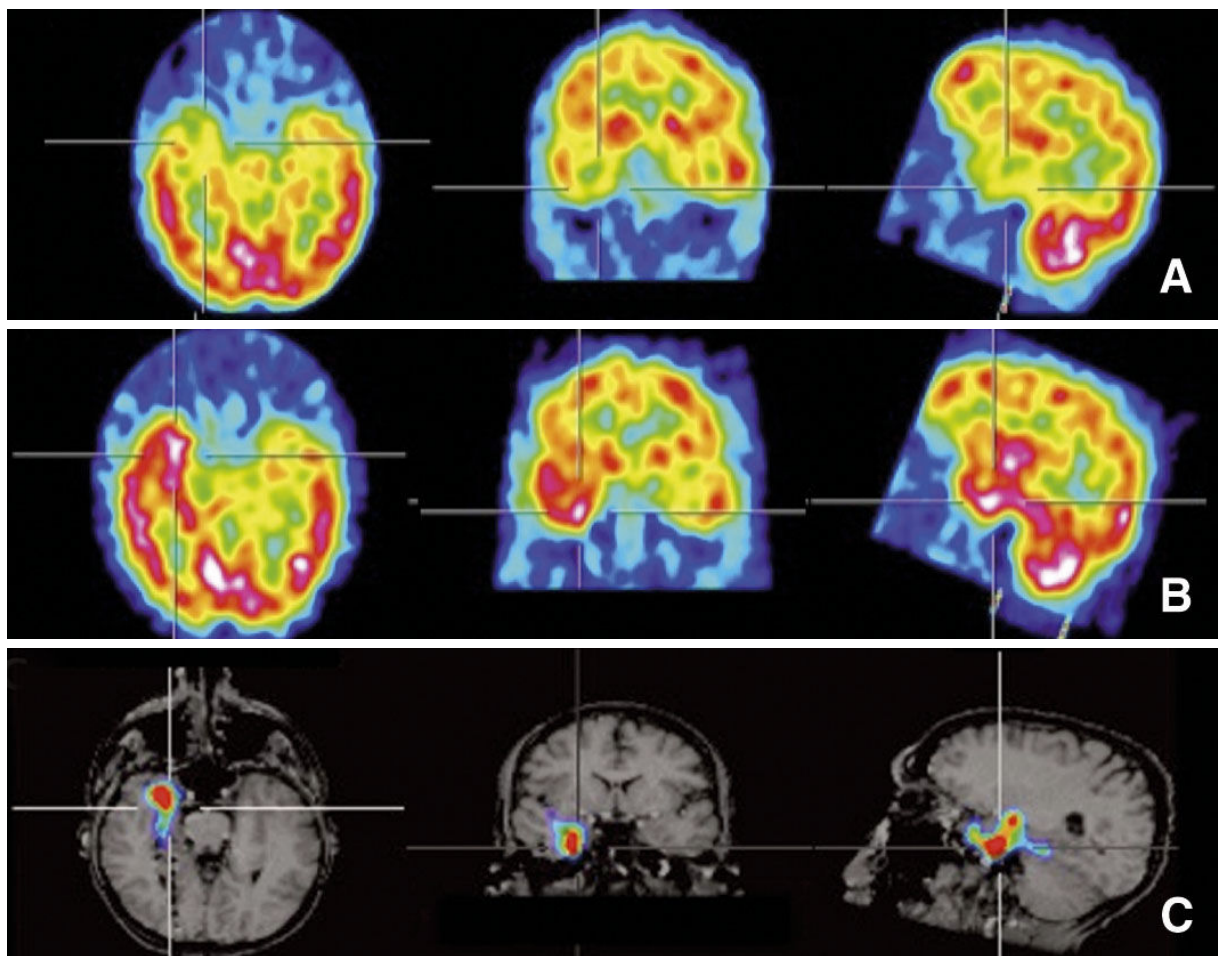


Figure I-2-3. Technique du Subtraction Ictal SPECT Coregistered to MRI (SISCOM) (O'Brien *et al.* 1998). Coupes dans les trois plans de l'espace réalisées avec ^{99m}Tc -ECD injecté en phase interictale (A) et en phase ictale (B). Les deux volumes de TEMP sont recalés entre eux puis recalés sur l'IRM du sujet. Une soustraction (TEMP ictale moins TEMP interictale) est réalisée

après normalisation en intensité des deux volumes. L'image de soustraction est ensuite lissée et seuillée puis fusionnée à l'IRM (C) montrant la ZE de la face mésiale du lobe temporal droit.

2.2.2. TEP de métabolisme glucidique au ^{18}F -FDG

La TEP est une autre approche d'imagerie nucléaire dont le principe est basé sur le marquage d'une molécule d'intérêt avec un émetteur de positon (^{18}F par exemple). L'annihilation d'un positon avec un électron du milieu engendre une émission de deux photons dans des directions opposées que l'on détecte en coïncidence à l'aide d'une couronne de détecteurs (le tomographe). A partir des signaux de coïncidences enregistrés, les images sont reconstruites à l'aide d'algorithmes dédiés. Comparé à la TEMP, la TEP a essentiellement une meilleure sensibilité, de par le principe de collimation électronique qui remplace la collimation physique utilisée sur la gamma caméra en TEMP, et une résolution spatiale potentiellement meilleure (~5-6 mm).

La TEP au ^{18}F -FDG étudie le métabolisme cérébral au moyen du 2-désoxy-D-glucose, analogue du glucose marqué au fluor 18 qui utilise le même transporteur que le glucose pour pénétrer dans les cellules cérébrales, mais ne peut être métabolisé et reste donc piégé dans les cellules. Comme la TEMP, en routine clinique, la TEP au ^{18}F -FDG est réservée uniquement à l'évaluation préopératoire en EMT, chez l'enfant comme chez l'adulte, en complément de l'IRM.

De manière générale, la TEP au ^{18}F -FDG apparaît comme la méthode d'imagerie la plus sensible de détermination de la ZE en dehors de la crise. Sa résolution temporelle limitée ne permet pas l'étude de la phase critique. La TEP interictale retrouve un hypométabolisme localisé dans 70 à 80% des cas (Engel *et al.* 1990). En EMT, la zone d'hypométabolisme dépasse souvent la zone lésionnelle (**Figure I-2-4**). La responsabilité de la perte neuronale reste discutée. La possibilité de mécanismes de désafférentation a aussi été évoquée.

En résumé, dans la prise en charge de l'EMT en routine clinique, l'IRM reste la technique de référence pour diagnostiquer la SH. La sensibilité est similaire en TEP interictale et en TEMP ictale dans le bilan préopératoire. La TEP est actuellement disponible dans de nombreux centres de médecine nucléaire et particulièrement préférée chez l'enfant en raison des courtes durées d'acquisition. La TEMP ictale est limitée aux centres tertiaires d'épilepsie en raison de son coût indirect. Le bilan d'imagerie préopératoire permet d'obtenir environ 80% de guérisons post-opératoire avec suppression complète des crises.

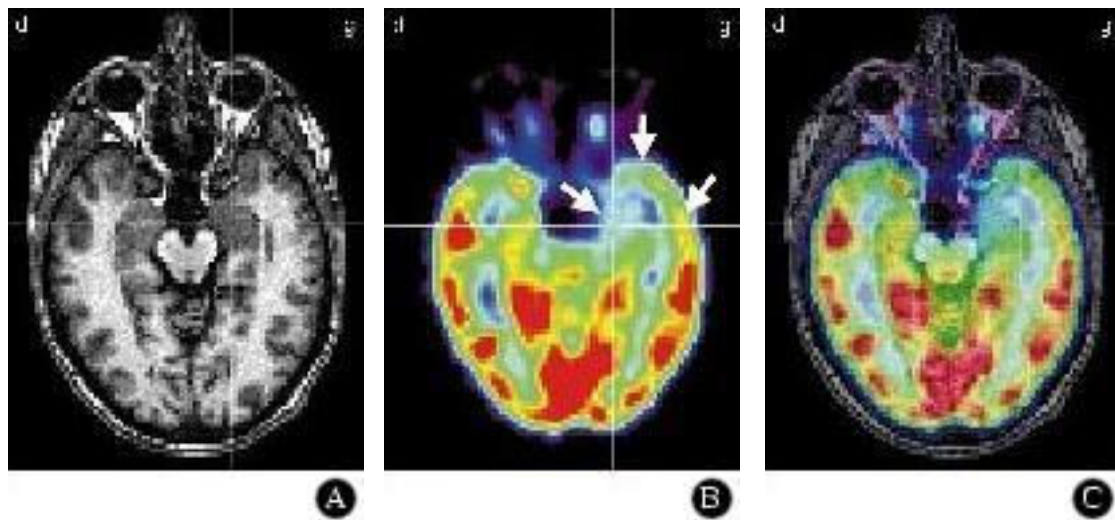


Figure I-2-4. TEP au ^{18}F -FDG dans l'épilepsie temporale interne. Recalage du TEP sur l'IRM. La zone d'hypométabolisme dépasse la zone temporale interne de la sclérose hippocampique. Elle s'étend au pôle temporal et au cortex temporal externe (flèches). A. IRM, B. TEP ^{18}F -FDG et C. Fusion (Engel *et al.* 1990).

2.2.3. Vers de nouvelles approches par l'imagerie moléculaire

L'avancée des technologies, notamment des traceurs TEP ciblant différents processus moléculaires, permet d'observer *in vivo* des mécanismes de la maladie à l'échelle moléculaire (récepteurs, neurotransmetteurs, protéines). Un enjeu majeur de l'imagerie moléculaire serait de permettre à chaque patient de bénéficier d'une caractérisation précise des dysfonctionnements associés à sa maladie afin de se voir proposer le traitement le mieux adapté. En EMT, le rôle de

l'imagerie moléculaire fait essentiellement l'objet de recherches cliniques et précliniques.

2.2.3.1. En recherche clinique

Avec de nouveaux radiotraceurs plus spécifique que ceux ciblant la perfusion ou le métabolisme glucidique, l'enjeu actuel est d'identifier tout le circuit épileptogène primaire pour ablation, en respectant au maximum les zones de diffusion secondaire afin de minimiser les séquelles neuropsychologiques, comportementales ou psychiatriques.

Récepteurs centraux aux benzodiazépines (CBR) (TEP au ^{11}C -flumazénil)

Les CBR ont été très étudiés en raison de l'hypothèse selon laquelle la transmission GABAergique, principal neuromédiateur inhibiteur, devait être altérée dans l'épilepsie. L'étude de la transmission GABAergique peut être réalisée avec un antagoniste des benzodiazépines (BZD), le ^{11}C -flumazénil. En EMT, les anomalies des CBR (correspondant à une diminution de la densité de récepteur) sont beaucoup plus limitées que l'hypométabolisme intercritique (Savic *et al.* 1988) (**Figure I-2-5**). L'application en routine clinique reste encore limitée en raison de très courte demi-vie de ^{11}C (20 minutes) nécessitant un cyclotron sur place.

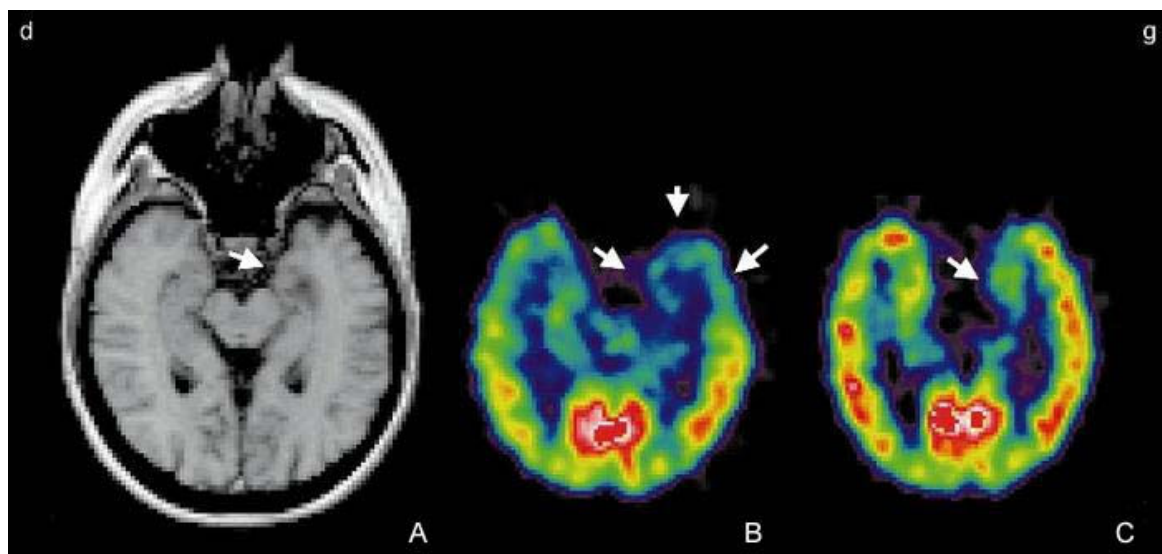


Figure I-2-5. Comparaison des anomalies en TEP au ^{18}F -FDG (B) et au ^{11}C -flumazénil (C)

en cas de sclérose de l'hippocampe sur l'IRM (A) : les anomalies en flumazénil sont plus limitées que l'hypométabolisme intercritique (flèches) (Savic *et al.* 1988).

Récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR) (TEP TSPO)

Lors d'une étude de l'effet thérapeutique des benzodiazépines (BDZ) lié à leur fixation sur les CBR, les PBR ont été découverts fortuitement en 1977 en utilisant le tissu rénal du rat comme témoin de la fixation non-spécifique du diazépam (Braestrup & Squires 1977). Le terme de PBR a été remplacé par TSPO (Papadopoulos *et al.* 2006) (protéine translocatrice de 18kDa) pour mieux décrire sa fonction dans le transport du cholestérol au niveau de la membrane mitochondriale externe.

La TSPO est à l'heure actuelle considérée comme un marqueur de la neuro-inflammation qui peut être tracé par différents ligands radioactifs (Chen & Guilarte 2008). Cette protéine sera décrite en détail dans la **partie 4.1** et ces radiotraceurs dans la **partie 5.1** de ce chapitre.

Dans l'EMT, l'étude de la neuroinflammation est motivée car une réaction gliale importante a été longtemps rapportée dans la SH réséquée (Blumcke *et al.* 2013). L'augmentation du signal TSPO a été mise en évidence dans la SH chez des patients d'EMT (Hirvonen *et al.* 2012) (**Figure I-2-6**). Le Pr. Bouilleret a un projet en cours sur le rôle de l'imagerie TSPO chez des patients d'épilepsie pharmacorésistante. Ses objectifs sont de déterminer si l'imagerie TSPO peut délimiter la ZE plus précisément que l'imagerie des anomalies métaboliques et de détecter potentiellement des anomalies extrahippocampiques.

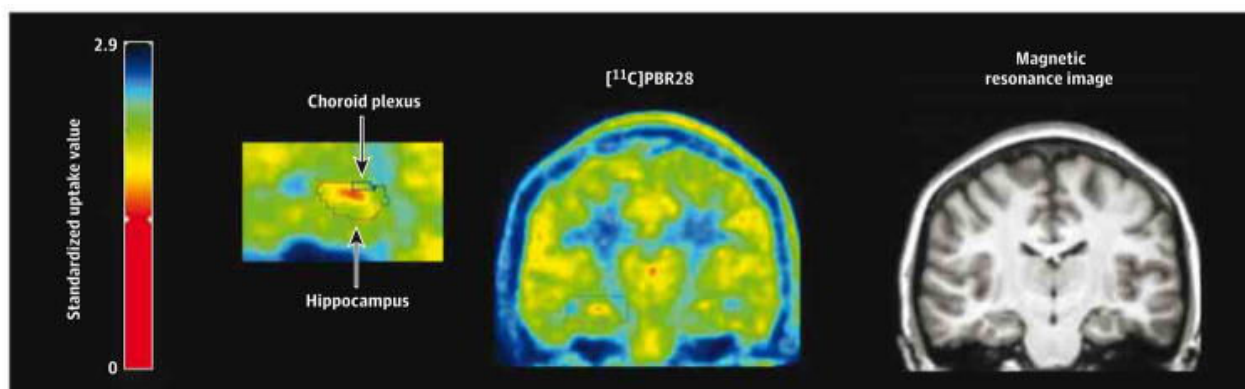


Figure I-2-6. Image de ^{11}C -PBR28 montrant un signal TSPO élevé à droite dans la SH chez l'EMT (Gershen *et al.* 2015).

D'autres radiotraceurs ciblant des récepteurs spécifiques sont actuellement étudiés en épilepsie mais leurs rôles ne sont pas encore précisément définis en EMT. Ils sont résumés dans le **tableau I-2-1**.

Tableau I-2-1. Résumé d'autres récepteurs spécifiques étudiés en épilepsie.

Cibles	Radiotraceurs	Bibliographies
P-glycoprotéine	^{11}C -verapamil	(Bauer <i>et al.</i> 2014), (Feldmann <i>et al.</i> 2013)
Tryptophane	α - ^{11}C -methyl-L-tryptophan	(Kumar <i>et al.</i> 2011), (Chugani <i>et al.</i> 2013)
5-HT _{1A} sérotonine	^{18}F -MPPF	(Toczek <i>et al.</i> 2003), (Theodore <i>et al.</i> 2012)
Mu-opiacé	^{11}C -cerfentanil	(Frost <i>et al.</i> 1988)
Delta opiacé	^{11}C -MeNTI	(Mayberg <i>et al.</i> 1991)

2.2.3.2. En recherche préclinique

Bien que les nouvelles techniques d'imagerie rendent les études chez l'homme plus accessibles, les considérations éthiques, l'importante variabilité interindividuelle, le manque de contrôles et le nombre limité de sujets, rendent indispensable d'utiliser des modèles animaux. Ces

modèles sont précieux pour étudier les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans l'épileptogénèse et l'ictogénèse en EMT.

Modèle d'épilepsie chez le rat

La plupart des études précliniques d'imagerie cérébrale en épilepsie sont réalisées chez le rat grâce à la « grande » taille du cerveau comparée à celle de la souris. Ces modèles d'EMT chez le rat reproduisent globalement bien la période d'épileptogénèse mais aucun modèle à ce jour ne reproduit la répétition de crises spontanées sans généralisation avec des lésions neuronales restant limitées à l'hippocampe et des caractéristiques de la SH retrouvée chez l'homme (Bouilleret 1999). Les principaux modèles d'épilepsie limbique chez le rat ainsi que leurs limites sont résumés dans le **tableau I-2-2**, adapté de (Kandratavicius *et al.* 2014).

Tableau I-2-2. Résumé des limites de principaux modèles d'épilepsie limbique chez le rat.

Modèle	Induction	Limites
Chémoconvulsivants		
Acide kaïnique	Injection systémique ou intrahippocampique	Haute mortalité; fréquence et sévérité des crises spontanées variables; SH atypique ; lésion extra hippocampique ; manque de reproductibilité
Pilocarpine	Injection systémique ou intrahippocampique	Haute mortalité; absence des crises récurrentes spontanées; SH atypique; lésions néocorticales ; manque de reproductibilité
Stimulations électriques locales		
	Stimulations répétées, de durée brève et d'intensité faible	Absence de crises récurrentes spontanées, généralisation systématique des crises, absence de SH avérée
	Stimulations intenses et prolongées de la voie perforante	Généralisation systémique des crises, larges lésions extrahippocampiques

Modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'acide kaïnique (AK) chez la souris

L'AK (acide (2-carboxy-4-isopropényl-3-pyrrolidinyl)-acétique) est un analogue cyclique du L-glutamate initialement isolé d'une algue rouge japonaise (*Digenea simplex*). C'est un agoniste puissant et sélectif des récepteurs glutamatergiques, en activant préférentiellement les récepteurs non-NMDA (AMPA et AK) (Vincent & Mulle 2009).

De premières études sur les conséquences après injection intrahippocampique d'AK chez le rat et la souris ont été réalisées il y a 20 à 30 ans (Cavalheiro *et al.* 1982, Schwarcz *et al.* 1978, Suzuki *et al.* 1995). Cependant, l'AK est devenu plus populaire lorsque (Bouilleret *et al.* 1999) ont validé que le modèle induit par injection intrahippocampique d'AK conduisait à une lésion de sclérose hippocampique très localisée, typique et à des crises récurrentes et spontanées similaires à celles observées chez l'homme.

Les caractéristiques du modèle décrites par la suite sont basées sur la thèse du Professeur Bouilleret (Bouilleret 1999). Le taux de mortalité est faible (environ 10-20% versus 30-50% chez le rat) permet de réaliser les études longitudinales. Un autre aspect important est la reproductibilité des caractéristiques du modèle qui rend plus robuste l'étude du signal inflammatoire mis en évidence en TEP à chaque période évolutive.

En termes de comportements, après injection d'AK, toutes les souris présentent un état de mal non convulsif (immobilité, déviation clonique de la tête controlatérale au site d'injection et associée à des épisodes de mâchonnement) et rarement des crises généralisées. L'état de mal peut durer jusqu'à 48h après injection. Ensuite, la période silencieuse ou l'épileptogénèse dure environ 2 semaines. Des crises spontanées et récurrentes apparaissent à partir de 14 jours après injection et persistent durant toute la vie de la souris (au moins jusqu'à 18 mois après injection).

En termes de conséquences histologiques, la constitution de la sclérose hippocampique est divisée en deux temps. La perte sélective des cellules du hile du gyrus survenant dans les 2 à 24 heures suivant l'injection alors que certaines cellules des couches CA1 et CA4 (voir la figure d'anatomie de l'hippocampe de la **partie 3.2** du même chapitre) présentant un aspect pycnotique clair à 7 jours constituent l'atteinte histologique essentielle de la phase d'épileptogénèse. Dans une deuxième phase débutant environ 15 jours après l'injection d'AK, la perte cellulaire est plus marquée dans les régions de CA1 et CA4 et est associée à une dispersion des cellules granulaires. Ces modifications vont progresser lentement jusqu'au 4^{ème} mois, temps auquel la couche des cellules pyramidales a quasiment disparu. Après le 4^{ème} mois, les modifications histologiques n'évoluent plus mais la crise récurrente purement hippocampique persiste durant toute la vie de la souris. Les caractéristiques temporelles du modèle sont résumées dans le schéma suivant.

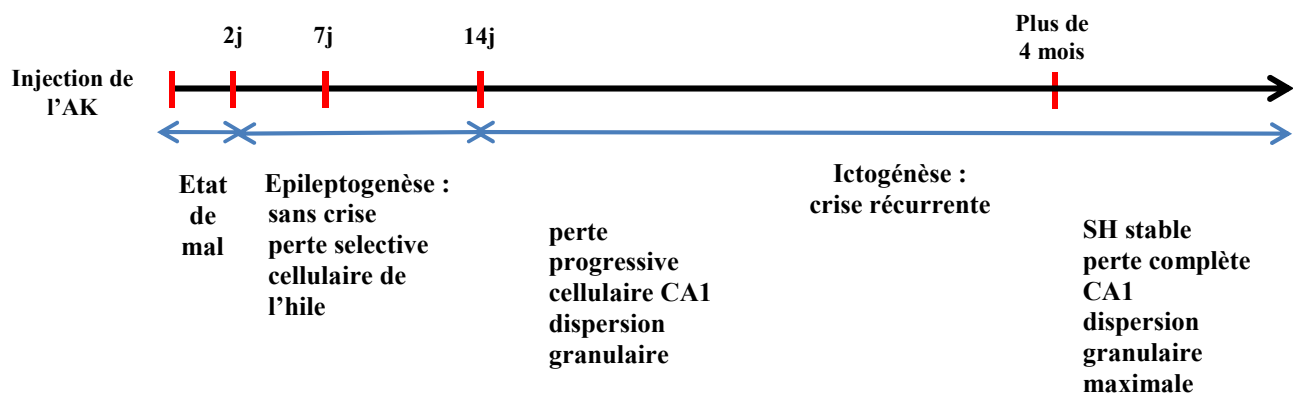


Figure I-2-7. Schéma résumant des caractéristiques du modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'AK chez la souris

Enjeu actuel de recherche préclinique

L'enjeu actuel de la recherche préclinique est résumé dans la **figure I-2-8**. Le mécanisme de neuroinflammation (caractères rouges) pourrait être impliqué à n'importe quel moment dans l'EMT. Les modèles chez le rat étant variables, moins reproductibles, pourraient potentiellement ne pas permettre de détecter ce processus inflammatoire durant la période d'ictogénèse.

Au contraire, notre projet utilise le modèle d'EMT chez la souris induit par injection intrahippocampique d'acide kaïnique. Ce modèle a été validé par plusieurs équipes comme reproduisant correctement la période d'épileptogénèse et la période d'ictogénèse avec une SH typique et reproductible (Bouilleret *et al.* 1999, Groticke *et al.* 2008, Heinrich *et al.* 1998, Pernot *et al.* 2011, Riban *et al.* 2002). Valider la technique et étudier la neuroinflammation dans ce modèle fait l'objet de ma thèse.

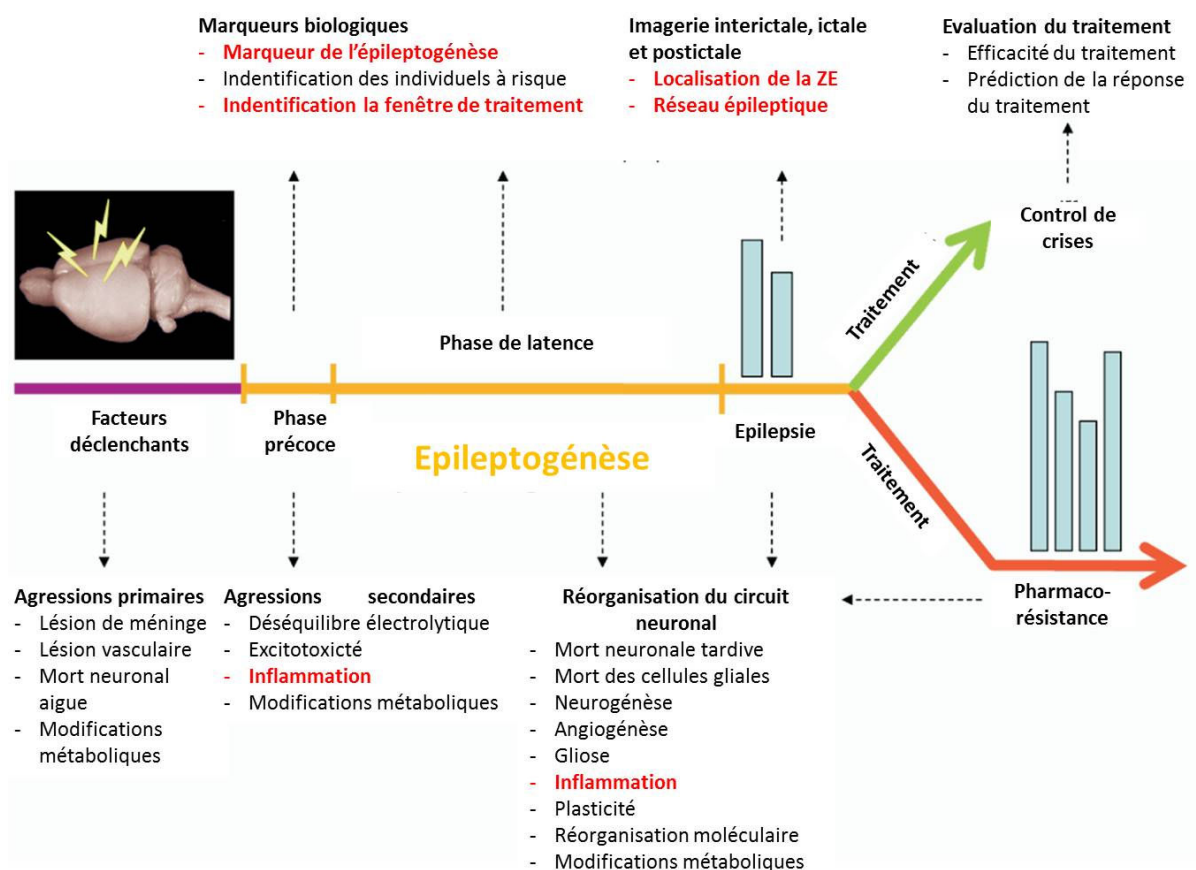


Figure I-2-8. Schéma des enjeux actuels dans la recherche préclinique en épilepsie adapté de (Goffin *et al.* 2008).

3. Rôle de la neuroinflammation et de ses composants en EMT

L'inflammation ou la réponse inflammatoire est un ensemble de mécanismes protecteurs des tissus vivants contre des agressions endogènes ou exogènes. Elle fait intervenir des cellules immunitaires, des vaisseaux sanguins, des modifications de la matrice extracellulaire et de

nombreux médiateurs chimiques pour éliminer l'agent pathogène, isoler le tissu lésé du tissu sain et détruire des cellules endommagées. Son but principal est de rétablir l'état physiologique mais parfois la réponse est si agressive qu'elle peut entraîner elle-même un état pathologique.

L'inflammation est donc un phénomène de défense pouvant concerner toute partie de l'organisme avec des mécanismes plus ou moins similaires. Lorsque ce processus concerne le système nerveux central (SNC), le terme de **neuroinflammation** est utilisé. Cette partie décrit les principaux composants de la neuroinflammation impliqués dans la physiopathologie de l'épilepsie mais également les méthodes d'imagerie pouvant cibler ces composants.

3.1. Généralités

Comme en périphérie, la réponse neuroinflammatoire se développe à la suite d'agressions traumatiques, ischémiques, infectieuses ou d'un état de mal. L'induction d'un état de mal par l'administration de convulsivants tels que l'acide kaïnique (AK) ou la pilocarpine chez les rongeurs est une des méthodes les plus utilisées pour étudier les processus inflammatoires impliqués en épilepsie (Kandratavicius *et al.* 2014).

Une des particularités de la neuroinflammation par rapport à l'inflammation périphérique est la présence des cellules gliales résidentes du système nerveux que sont les **microglies** et les **astrocytes** et d'une structure complexe protégeant le cerveau, la **barrière hémato-encéphalique (BHE)**. La neuroinflammation est caractérisée par une activation des cellules gliales et un dysfonctionnement de la BHE accompagnés d'une invasion des cellules immunitaires périphériques (Vezzani *et al.* 2011). Elle se traduit par une surexpression de différents types de protéines qui interviennent plus ou moins spécifiquement dans ce processus et en font des cibles potentielles pour des études par imagerie moléculaire ciblant ces protéines.

Les cellules microgliales représente entre 5 et 20% des cellules gliales qui constituent la population cellulaire non-neuronale. Ces cellules d'origine monocyttaire ont un rôle de sentinelles. Elles prédominent dans la substance grise où elles surveillent des neurones. Elles sont également présentes au voisinage des vaisseaux sanguins ce qui leur permet de sonder l'environnement. Elles sont très sensibles aux variations biochimiques du parenchyme cérébral et sont rapidement activées à la suite d'une agression cérébrale. Ces cellules activées assurent la fonction phagocytaire et modulent la réponse inflammatoire en produisant différents médiateurs moléculaires (Hailer 2008).

Les cellules microgliales peuvent être reconnues en mettant en évidence par IHC un certain nombre de protéines qui les caractérisent : CD11b, Iba1, CD68, ED1 ou isolectine IB4 (Guillemin & Brew 2004). En l'absence de facteurs stimulants, les microglies ont une forme quiescente, ramifiée, adaptée pour la fonction de surveillance et se caractérisent par une expression faible du CD11b (**Figure I-3-1A**). En s'activant, elles expriment plus fortement le CD11b et se transforment par une hypertrophie de leur corps cellulaire accompagnée d'un raccourcissement des prolongements cytoplasmiques (**Figure I-3-1C**). Dans leur dernier stade d'activation, les cellules microgliales prennent une forme amiboïde, et sont indiscernables des macrophages périphériques infiltrés au niveau du parenchyme cérébral (**Figure I-3-1D**). L'activation est potentiellement réversible avec la disparition des agressions. L'évolution spatiale et temporelle des microglies activées en fonction de différentes maladies fait l'objet de nombreuses études expérimentales (Hernandez-Ontiveros *et al.* 2013, Mandrekar-Colucci & Landreth 2010, Vezzani *et al.* 2011).

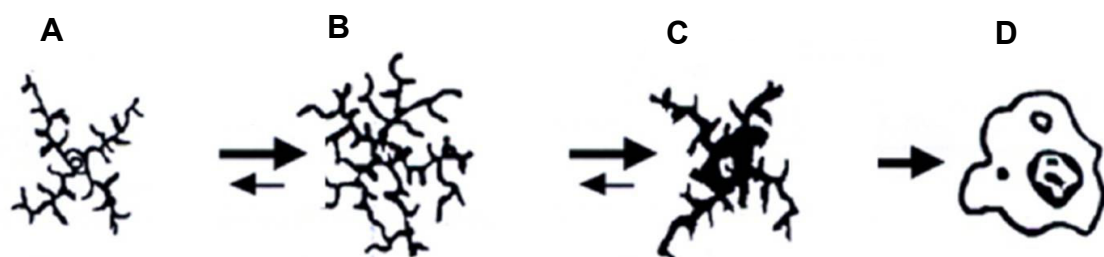


Figure I-3-1. Représentation schématique des variations morphologiques de la cellule

microgliale suite à son activation par une agression du SNC, adaptée de (Streit *et al.* 1999). (A). Cellule ramifiée (quiescente), (B) Cellule hyper-ramifiée (activée), (C) Cellule du corps hypertrophié et raccourcissement des branches (réactivée), (D) cellule améboïde (phagocytaire).

Les cellules astrocytaires sont les cellules gliales les plus nombreuses. Elles sont caractérisées par l'expression de la protéine acide des gliofilaments (GFAP) et par une morphologie particulière liée à la présence de prolongements cytoplasmiques leur donnant une forme étoilée. Elles entourent le neurone et la fente synaptique et recouvrent complètement la surface des capillaires et les pieds vasculaires de la BHE (**Figure I-3-2**). Leur rôle essentiel est de réguler l'homéostasie cérébrale. Il s'agit de régulation du métabolisme du glucose, des taux extracellulaires de K^+ et aussi des neurotransmetteurs, en particulier la recapture du glutamate qui est susceptible d'influencer fortement la synchronisation neuronale (Sofroniew & Vinters 2010).

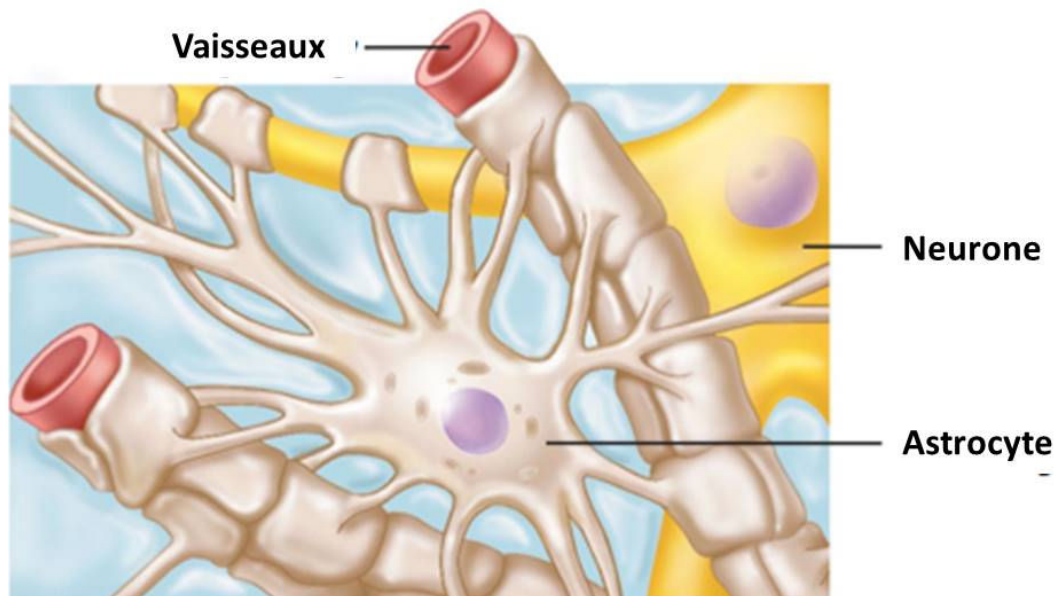


Figure I-3-2. Représentation schématique de l'astrocyte dans sa relation avec le neurone et les vaisseaux (Copyright © 2009 Pearson Education, Inc, publishing as Pearson Benjamin Cummings).

A l'état basal, des astrocytes présentent une morphologie classique avec une forme d'étoile et des branches fines. Une fois activée (état d'**astrogliose**), les astrocytes jouent également un rôle dans la modulation de la réponse neuroinflammatoire, souvent dans des zones superposables à celles des lésions neuronales et de l'activation microgiale, mais avec retardement pour construire la cicatrice gliale (**Figure I-3-3**).

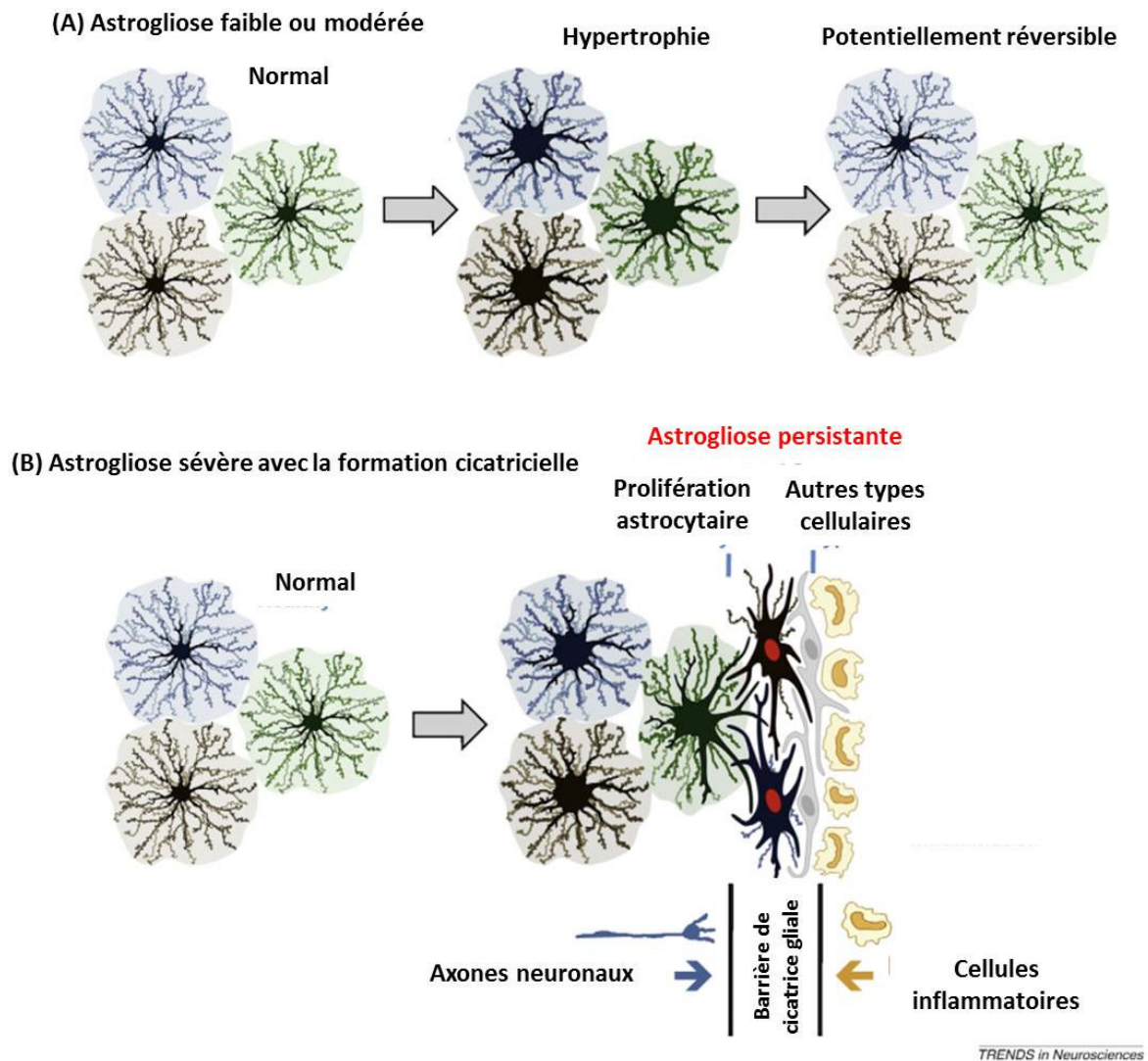


Figure I-3-3. Représentation schématique des variations astrogliotiques en fonction des agressions initiales. (A) Aggression faible ou modérée entraînant une astrogliose faible ou modérée, potentiellement réversible au cours du temps. (B) Aggression intense entraînant une astrogliose sévère avec la formation de la barrière cicatrice gliale. Adaptée de (Sofroniew 2009).

La **BHE** est une structure unique dans le système nerveux central qui l'isole vis-à-vis de l'environnement périphérique. Elle se compose d'astrocytes et de cellules endothéliales qui peuvent être reconnues par des marqueurs d'IHC tels que le CD31 ou le Glut1 (Abbott *et al.* 2006). Son caractère unique réside dans le fait que les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et tapissent les capillaires du côté du flux sanguin. Cela crée une barrière qui permet un échange sélectif entre le sang et le parenchyme cérébral. Lors de la réponse inflammatoire, des médiateurs sécrétés par des microglies ou des astrocytes réagissant sur des protéines d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales régulent la perméabilité de la BHE qui permet l'infiltration des cellules immunitaires périphériques (leucocytes) vers le parenchyme cérébral.

3.2. Neuroinflammation et sclérose hippocampique

La SH est la lésion caractéristique de l'EMT mais les mécanismes conduisant à la sclérose ne sont pas connus. Depuis ces dernières années, de nombreuses études ont révélé le rôle de la neuroinflammation dans la constitution de la SH chez des patients épileptiques ainsi que chez des modèles rongeurs (Vezzani *et al.* 2011).

L'hippocampe est une structure située à la face mésiale/interne du lobe temporal. L'architecture cellulaire et l'organisation des cellules principales permettent de définir 3 zones distinctes : la corne d'Ammon, le gyrus dentelé et le subiculum.

La **corne d'Ammon** (CA) est subdivisée en plusieurs régions distinctes de cellules pyramidales, actuellement dénommées CA1a, CA1b, CA1c, CA2, CA3a, CA3b et CA3c ou également CA4 (**Figure I-3-4**).

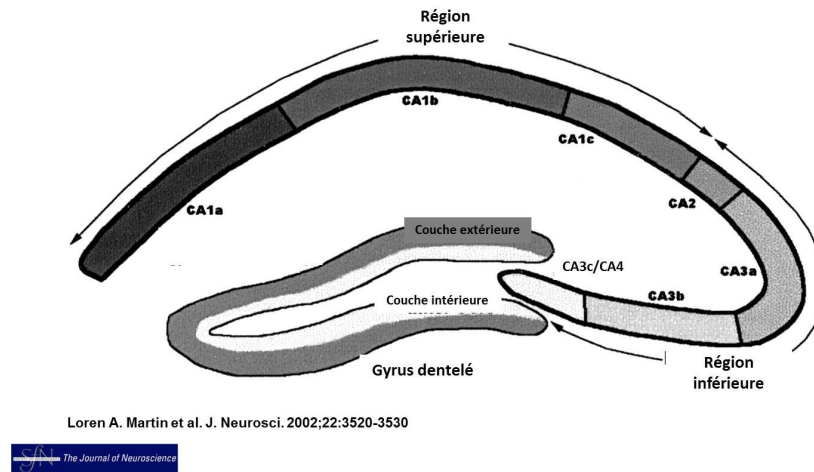


Figure I-3-4. Illustration de la cornue d'Ammon et du gyrus dentelé de l'hippocampe normal de la souris.

Les cellules principales du **gyrus dentelé** sont représentées par les cellules en grains et les cellules moussues du hile. Les cellules granulaires sont disposées en une bande compacte recourbée délimitant le hile du gyrus dentelé constitué de la couche polymorphe et de l'aire CA3c/CA4. Les dendrites des cellules granulaires constituent la couche moléculaire (*stratum moléculaire*). Les axones de ces mêmes cellules, appelées fibres moussues, passent par le hile et vont former le premier relais synaptique au niveau des cellules principales de CA3c/CA4 (**Figure I-3-5**).

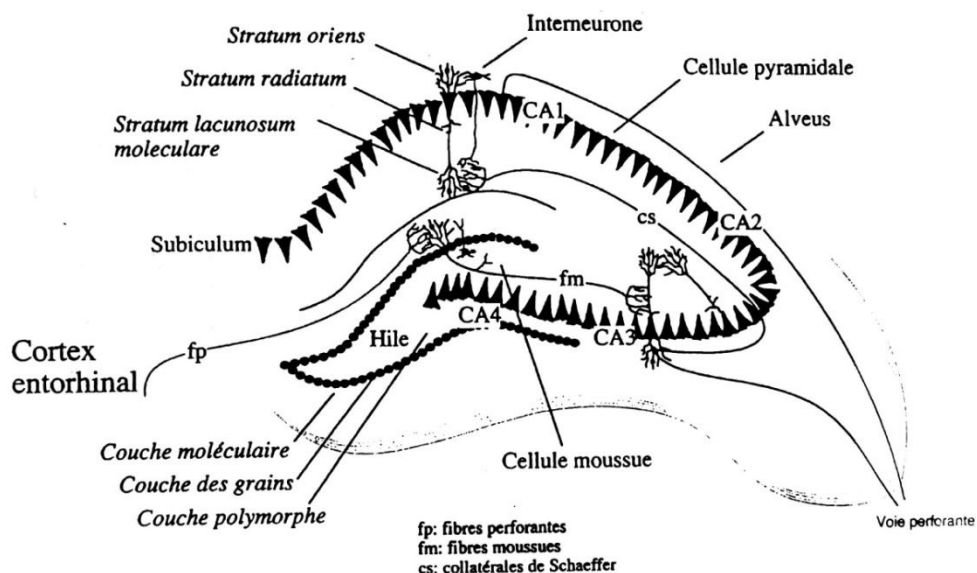


Figure I-3-5. Schéma de l'organisation cytoarchitecturale de l'hippocampe du rat (Bouilleret 1999).

Le subiculum constitue une zone de transition entre l'archicortex hippocampique et le néocortex. Il débute à l'extrémité de l'aire CA1 et se caractérise par un épaississement de la couche pyramidale.

Chez l'homme, la sclérose hippocampique est caractérisée par une perte neuronale au niveau de la corne d'Ammon (**Figure I-1-3**). Cette perte neuronale est toujours associée à une astroglie importante (Blumcke *et al.* 2013).

La LICE distingue cette lésion en 3 types. Le type 1 (60-80% des cas) est typique et consiste en une perte neuronale sélective de CA1 et CA4 et, dans une moindre mesure et moins systématiquement, de CA3. Une dispersion de la couche granulaire est fréquente, mais non constante. Deux autres types sont plus rares : le type 2 correspond à une perte neuronale prédominant uniquement au niveau CA1 et le type 3 correspond à celle de CA4. 20% des cas d'épilepsie du lobe temporal ne présentent qu'une astroglie importante mais sans perte neuronale significative.

Contrairement à l'astroglie longtemps rapportée et bien connue comme un processus cicatriciel, certaines études chez l'homme relèvent la présence de microglies réactives au niveau de la lésion sclérotique, suggérant son rôle neurotoxique induisant la perte neuronale (Ravizza *et al.* 2008).

Le dysfonctionnement de la BHE dans la SH est caractérisé par une prolifération des micro-vaisseaux, une expression des récepteurs VEGF (vascular endothelial growth factor) et une perte de l'intégrité de la BHE. Sur cette BHE est observée aussi la surexpression des protéines de transporteurs de médicaments telles que la p-glycoprotéine ou les protéines associées à la

pharmaco-résistance. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'échec des traitements en facilitant l'élimination des médicaments antiépileptiques, les empêchant ainsi d'atteindre leur cible (Marchi *et al.* 2012).

Chez des modèles rongeurs, la neuroinflammation est beaucoup étudiée chez le rat ou la souris après l'administration de convulsivants tels que l'acide kaïnique ou la pilocarpine (Vezzani *et al.* 2011). Ces modèles présentent des analogies avec les anomalies observées chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal, dont la sclérose hippocampique (Kandratavicius *et al.* 2014). Ces modèles sont caractérisés par un état de mal durant jusqu'à 48h après induction, puis par une période silencieuse d'épileptogénèse (1 à 2 semaines après induction) et enfin par une période d'ictogénèse marquée par la première apparition des crises spontanées et récurrentes. L'épileptogénèse est le caractère commun retrouvé dans les modèles rat et souris alors que les phases de l'état de mal et d'ictogénèse sont différentes dans ces deux modèles (voir la **partie 2.2.3.2** du même chapitre).

La sclérose hippocampique est une lésion clé chez les patients épileptiques, et l'épileptogénèse est actuellement considérée comme la période primordiale pendant laquelle la sclérose hippocampique est initiée chez les modèles rongeurs.

L'activation microgliale est le caractère le plus étudié pendant l'épileptogénèse. Il se manifeste par une accumulation de microglie activée au niveau de la couche pyramidale. Ce phénomène peut s'observer à partir de 3 jours après induction du modèle, prédomine durant l'épileptogénèse et persiste aussi pendant la période chronique (Ravizza *et al.* 2008). Des microglies hypertrophiées accompagnées d'un raccourcissement des prolongements cytoplasmiques, s'accumulant dans la zone de la « mort » neuronale, sont des caractères concordants entre différents modèles rongeurs durant l'épileptogénèse. Durant la période chronique, la persistance des

microglies activées ou réactivées est différente en fonction de la durée pendant laquelle les animaux sont suivis dans chaque étude.

L'activation astrocytaire est aussi observée en parallèle à l'activation microgliale. Cependant, l'accumulation astrocytaire est plus homogène au sein de l'hippocampe alors que les microglies activées se concentrent davantage au niveau des lésions neuronales. L'activation astrocytaire a été moins étudiée chez le modèle du rat, notamment à 6 mois ou 1 an après induction. Au contraire, chez le modèle de souris, l'activation astrocytaire a été observée comme intense au temps chronique et sa distribution est très similaire à celle observée chez l'homme épileptique avec SH (Bouilleret *et al.* 1999).

La rupture de la BHE est aussi observée en lien avec l'état de mal. Cela entraîne l'infiltration des monocytes dans le cerveau. Ceux-ci ont des propriétés plus toxiques que des microglies, suggérant que l'épileptogénèse serait plutôt en lien avec des cellules immunocytaires périphériques (Zattoni *et al.* 2011).

Cette rapide présentation montre que la neuroinflammation est un phénomène très complexe. Ses mécanismes biomoléculaires et les voies de signalisation impliquées dans l'épileptogénèse nécessitent encore de nombreuses études pour en élucider les mécanismes. Un des besoins de ces études est la possibilité de suivre ces processus *in vivo*. La prochaine partie de ce manuscrit est dédiée à la présentation des cibles composant la neuroinflammation et qui peuvent être imagées *in vivo*.

4. Imagerie de neuroinflammation en épilepsie

4.1. Imagerie de l'activation microgliale

La cible la plus étudiée de l'activation microgliale est la protéine translocatrice (TSPO). La

TSPO est une protéine de 18kDa constituée de 169 acides aminés organisés en 5 hélices α transmembranaires dont la localisation principale est la membrane externe de la mitochondrie (Korkhov *et al.* 2010). Cette protéine est présente dans tous les tissus, mais plus particulièrement dans les tissus synthétisant le stéroïde comme les glandes surrénales ou les testicules. Dans un cerveau sain, l'expression de TSPO est très faible, et est principalement localisée dans les cellules épendymales recouvrant les cavités ventriculaires du SNC, dans le plexus choroïde mais aussi dans les cellules endothéliales (Cosenza-Nashat *et al.* 2009).

En présence d'une atteinte cérébrale, l'expression de TSPO devient importante, principalement par les cellules microgliales ou les macrophages infiltrés mais aussi par des cellules astrocytaires (Venneti *et al.* 2006). La surexpression de la TSPO par des microglies a été bien démontrée en IHC dans diverses maladies cérébrales chez l'homme ainsi que dans des modèles animaux (Chen & Guilarte 2008, Cosenza-Nashat *et al.* 2009). Le mécanisme potentiel de la surexpression de la TSPO n'est pas encore clairement défini. Il pourrait être lié à une augmentation à la fois du nombre de mitochondries dans la cellule microgliale activée et du nombre de TSPO par mitochondrie (Veiga *et al.* 2007). Cela rend cette cible intéressante pour imager *in vivo* l'activation microgliale.

De nombreux radiotraceurs ont été développés pour cibler cette protéine : la première génération (^{11}C -PK11195) présentait une haute fixation non-spécifique et a conduit au développement de traceurs de seconde génération (^{18}F -DPA-714, ^{18}F -GE-180, ^{18}F -PBR111) qui présentent moins de fixation non-spécifique. L'imagerie de la TSPO a été utilisée dans différentes pathologies cérébrales telles que la maladie d'Alzheimer (James *et al.* 2015), l'accident vasculaire cérébral (Lartey *et al.* 2014), le trauma du cerveau (Israel *et al.* 2016), la sclérose en plaques (Banati *et al.* 2000) et plus récemment l'épilepsie. Cette dernière application sera plus largement développée dans la **partie 5** de ce chapitre.

Une autre cible potentielle pour étudier la neuroinflammation est le récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (CB2) décrit comme étant surexprimé sur des microglies activées dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et la sclérose en plaques. Cependant, sachant que l'analogue de CB2 et le récepteur cannabinoïde type 1 (CB1) sont présents en quantité abondante dans le système nerveux central, le radiotracer utilisé doit être plus hautement spécifique du CB2 par rapport au CB1. Une autre limite est que l'affinité du CB2 pour un même ligand varie en fonction de l'espèce, notamment entre l'homme et le rongeur. Certains radiotraceurs TEP ciblant le CB2 ont été développés, tels que ^{11}C -KD2, ^{18}F -FE-PEO, ^{18}F -FE-GW405833 et ^{11}C -NE40 mais des études de validation sont nécessaires avant leur utilisation préclinique et clinique. En épilepsie, l'imagerie de CB2 n'est pas encore été réalisée en clinique ni en préclinique. Seuls, Zurolo et al. (2010) ont montré une colocalisation entre le CB2 et la microglie sur des lésions de dysplasie corticale focale chez des patients épileptiques.

De nombreux radiotraceurs sont en cours de développement pour cibler des protéines plus spécifiques de la microglie, telles que les enzymes cyclooxygénase (COX) qui interviennent directement dans la régulation des processus neuroinflammatoires par production des seconds messagers lipidiques de type leucotriènes et prostaglandines. Parmi différentes isoformes de COX, la COX-2 est surexprimée en réponse à la neuroinflammation. Des radioligands COX2 comme le ^{11}C -Celecoxib (Majo *et al.* 2005) ou le ^{11}C -Rofecoxib (de Vries *et al.* 2008) ont été évalués mais n'ont pas conduit aux résultats escomptés en raison soit de la fixation non-spécifique élevée, soit de la faible sensibilité *in vivo* (de Vries *et al.* 2006, Laube *et al.* 2013).

4.2. Imagerie de l'activation astrogliale

Actuellement, la protéine GFAP est connue comme la protéine la plus surexprimée dans le cas d'activation astrocytaire mais il n'existe pas un ligand ciblant cette protéine ou son analogue en

imagerie *in vivo*.

La monoamine oxydase de type B (MAO-B) est actuellement considérée comme la principale cible disponible pour visualiser *in vivo* l'activation astrocytaire. Cette enzyme présente en quantité abondante dans l'astrocyte est surexprimée lors de leur activation. Différents radioligands ont été évalués tel que le ^{11}C -dimethylphenethylamine, le ^{18}F -fluorodeprenyl ou encore le ^{11}C -deuteriumdeprenyl. Ce dernier a été utilisé souvent dans des essais cliniques et études précliniques malgré la courte demi-vie et un haut taux de radiométabolites entrant dans le cerveau. La TEP au ^{11}C -deuteriumdeprenyl a montré une fixation plus élevée au niveau de la zone épileptogène (détectée par l'EEG et l'IRM) chez des patients présentant une épilepsie du lobe temporal.

Le myo-inositol (mls) et la glutathione (GSH) sont deux métabolites du cerveau qui sont associés à l'activation gliale, en particulier à l'activation astrocytaire. La GSH, qui est un antioxydant protégeant les neurones, est principalement produit par des astrocytes, alors que le mls est spécifiquement localisé dans les astrocytes. Ces métabolites peuvent être identifiés et quantifiés par spectroscopie RMN. Filibian et al. (2012) ont montré une augmentation progressive de mls et GSH dans l'hippocampe des rats durant l'épileptogénèse et une stabilité de ces signaux aux temps chroniques quand les rats deviennent épileptiques. Une augmentation de mls est aussi retrouvée dans l'hippocampe des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal et dans le cortex des patients présentant une encéphalite de Rasmussen. Cependant, certaines études chez des patients avec épilepsie du lobe temporal ont démontré des valeurs de mls similaires, même diminuées, comparées celles des contrôles. Ces différences pourraient être dues aux traitements ou à l'hétérogénéité des pathologies sous-jacentes.

4.3. Imagerie du dysfonctionnement de la BHE et de l'invasion de cellules immunitaires périphériques

L'imagerie de l'intégrité de la BHE est basée sur l'injection d'un radiotraceur ou d'une substance à caractère magnétique qui ne traversent pas la BHE dans des conditions normales. La rupture de la BHE entraîne une fuite dans le parenchyme cérébral de ces agents qui peuvent alors être détectés par l'imagerie nucléaire ou par l'IRM.

L'IRM avec injection de gadolinium-diéthylènetriamine (Gd-DTPA) est la méthodologie d'imagerie la plus utilisée. Dans des modèles rongeurs utilisant l'IRM Gd-DTPA, Breuer et al. ont montré une rupture importante de la BHE correspondant à un hypersignal T1 au niveau des hippocampes 48h après induction du modèle par la pilocarpine et l'AK. Ces signaux diminuent dans le temps mais persistent même à 1 mois après l'induction de la lésion. Van Vliet et al. (2014) ont aussi montré une rupture de la BHE non-uniforme dans le système limbique chez le modèle du rat. La rupture est importante dans la période de l'épileptogénèse et diminue au temps chronique.

La rupture de BHE peut aussi être détectée par imagerie nucléaire telle que la TEP ^{68}Ga -EDTA ou la TEMP $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA mais ces méthodes sont moins utilisées que l'IRM pour cette application.

L'infiltration des cellules immunitaires périphériques comme des leucocytes peut être tracée *in vivo* par imagerie nucléaire. Un prélèvement sanguin permet de marquer des leucocytes aux $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO ou ^{111}In -oxinate, puis la réinjection des leucocytes marqués permet de les détecter en utilisant la TEMP. Une méthode alternative est d'injecter des particules superparamagnétiques ferrioxides qui sont absorbées par des leucocytes. La présence de ces particules se traduit par un hyposignal sur l'IRM T2. Cependant, à l'heure actuelle, aucun essai clinique ni aucune étude préclinique n'a utilisé ces méthodes en épilepsie.

En résumé, de nombreuses cibles et ligands associés sont en cours de développement pour

étudier *in vivo* la neuroinflammation en général et particulièrement en épilepsie. La plupart des ligands doivent encore être validés dans le contexte de l'épilepsie et pourraient s'avérer précieux pour étudier les mécanismes sous-jacents à l'épilepsie, mais aussi pour évaluer des médicaments antiépileptiques ciblant l'inflammation. Malgré ses limites, la protéine TSPO, la plus étudiée actuellement au moyen de différents traceurs, est considérée comme une cible de référence pour visualiser et quantifier l'activation microgliale et par conséquent la neuroinflammation.

5. Imagerie de la TSPO en épilepsie

L'imagerie de la TSPO représente actuellement un examen de référence pour le suivi *in vivo* du processus neuroinflammatoire impliqué dans des maladies du SNC. De nombreuses études cliniques et précliniques cherchent à étudier le rôle de la neuroinflammation dans l'épilepsie. En termes de diagnostic, la TEP de la TSPO pourrait détecter des foyers épileptogènes et mériterait d'être comparée avec la TEP au FDG. En termes de suivi thérapeutique, la TEP de la TSPO pourrait s'avérer être un bon biomarqueur pour évaluer l'efficacité des nouveaux médicaments antiépileptiques ciblant des médiateurs régulant la neuroinflammation, médicaments méritant d'être étudiés chez des patients atteints d'épilepsie pharmacorésistante.

Cette dernière partie présente les intérêts et limites de différents radiotraceurs de la TSPO, et décrit l'état de l'art actuel de l'imagerie de la TSPO dans des études cliniques et précliniques.

5.1. Intérêts et challenges de l'imagerie de la protéine TSPO

Le PK11195, un dérivé carboxamide de l'isoquinolone, marqué au ^{11}C , correspond à la première génération de radiotracer de la TSPO. Le ^{11}C -PK11195 a été le radiotracer de référence pendant 20 ans pour cibler la neuroinflammation dans diverses pathologies du SNC. Hormis son intérêt en imagerie, certaines études relèvent un effet thérapeutique de PK11195 dans l'épilepsie (Veenman *et al.* 2002). Par exemple, le prétraitement des rats avec du PK11195 diminue la

fréquence des crises épileptiques récurrentes chez le modèle induit par l'administration d'AK.

Malgré sa grande valeur, l'utilisation du ^{11}C -PK11195 présente d'importantes difficultés, notamment pour la quantification précise des variations d'expression de TSPO. En effet, le PK111195 est hautement lipophile (Lockhart et al. 2013) et a donc une liaison non-spécifique importante (liaison aux acides gras du cerveau), entraînant un faible rapport signal sur bruit dans les images TEP. La formation par le foie de radiométabolites suffisamment lipophiles pour passer la BHE complique aussi la quantification.

Un autre inconvénient majeur du PK11195 est l'indisponibilité d'un analogue radiomarqué au fluor-18, ce qui limite son développement pour une utilisation en routine clinique du fait de la courte période physique du carbone 11 (20 min).

En raison de ces limites, le développement de radiotraceurs alternatifs s'est avéré nécessaire pour permettre une quantification fiable de la TSPO et donc de la neuroinflammation et des effets de traitements anti-inflammatoires. Actuellement, il existe plus de 50 candidats pour cibler l'expression de TSPO, appartenant à 3 classes principales : les dérivés phénoxyphényl-acétamide comme le ^{11}C -PBR28 ou le ^{18}F -FEPAA, les dérivés pyrazolopyrimidine comme le ^{11}C -DPA-713 ou le ^{18}F -DPA-714 et les dérivés imidazopyridine acétamide comme le ^{18}F -PBR111. Cette seconde génération de traceurs présente l'avantage commun d'une bonne affinité et une bonne sélectivité pour la TSPO, améliorant ainsi le rapport signal sur bruit dans les images TEP (Dolle *et al.* 2009, Scarf *et al.* 2009, Tang *et al.* 2013).

Parmi eux, le ^{18}F -DPA-714 est l'une des molécules les plus prometteuses pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation. En effet, le DPA-714 a l'avantage de pouvoir être marqué au fluor-18 (Damont *et al.* 2008). La biodistribution du ^{18}F -DPA-714 et de ses radiométabolites a été aussi évaluée chez le rat et le babouin (Peyronneau *et al.* 2013). Comme chez le rat, l'évaluation du

traceur ^{18}F -DPA-714 chez la souris C57Bl6 a montré un résultat cohérent, avec une haute liaison spécifique du radiotraceur à la TSPO et une absence de radiométabolite dans le cerveau à 60 minutes après injection du radiotraceur (Vicidomini *et al.* 2015).

Le ^{18}F -DPA-714 a été évalué dans différentes maladies du CNS comprenant des composantes inflammatoires. Au sein du SHFJ, trois grands projets chez l'homme sont en cours pour évaluer le rôle de la TEP au ^{18}F -DPA-714 dans la maladie d'Alzheimer, les formes progressives de sclérose en plaques et la maladie de Parkinson. En imagerie préclinique, chez le rat, la TEP au ^{18}F -DPA-714 permet de visualiser l'activation microgliale dans plusieurs modèles de gliome (Winkerler *et al.* 2012) ou de lésion excitotoxique (James *et al.* 2008). Ory *et al.* (2014) ont démontré une évolution temporelle au niveau du striatum du ^{18}F -DPA-714 dans le modèle de neuroinflammation locale induite par LPS chez le rat. Chez la souris, la faisabilité a aussi été démontrée dans le modèle de sclérose latérale amyotrophique (Gargiulo *et al.* 2016) ou de traumatisme crânien (Wang *et al.* 2014). Cependant, sa quantification par modélisation cinétique reste encore compliquée, notamment chez les souris du fait de la difficulté à mesurer la fonction d'entrée du traceur.

De plus, l'utilisation de molécules issues de la deuxième génération se complexifie chez l'homme due à une affinité pour la TSPO influencée par un polymorphisme génétique (rs6971) situé dans l'exon 4 du gène codant pour la TSPO (Owen *et al.* 2012). Une substitution de l'acide aminé 147A par 147T entraîne une affinité inférieure des ligands pour la TSPO. On peut ainsi définir trois groupes de phénotypes de liaison à la TSPO dans la population: binder de haute affinité (HAB) exprimant seulement 147A, binder de faible affinité (LAB) exprimant seulement 147T et binder d'affinité mixte (MAB) étant hétérozygote et exprimant ces deux acides aminés dans la même proportion.

Ainsi, pour un même niveau d'expression de TSPO, l'intensité du signal TEP spécifique sera

la plus élevée pour les HAB suivis des MAB, et sera la moins élevée pour les LAB. L'importance de cette variabilité interindividuelle dépend aussi du radiotraceur. Par exemple, le ^{11}C -PBR28 possède une affinité à la TSPO 50 fois différente entre des variantes 147A et 147T alors cette différence n'est que de 4 fois pour le ^{18}F -PBR111 (Owen *et al.* 2012) et de 10 fois pour le ^{18}F -DPA-714.

Pour contourner ce problème, une troisième génération de radiotraceurs de TSPO est développée dans le but d'identifier des radiotraceurs insensibles au polymorphisme génétique (rs6971). Il existe actuellement le ^{11}C -ER176 (Ikawa *et al.* 2017) et le ^{18}F -GE180 (Fan *et al.* 2016) mais leur intérêt clinique reste à établir.

La modélisation cinétique de tous les radiotraceurs de la TSPO est compliquée par une fixation aux protéines plasmatiques élevée et variable d'un individu à l'autre (Banati *et al.* 2000), ce qui rend le calcul de la fonction d'entrée difficile. L'extraction de la fonction d'entrée à partir des images TEP est faisable mais le résultat est erroné en raison de liaison spécifique sur des cellules endothéliales (Notter *et al.* 2017, Wimberley *et al.* 2017). Cette fixation vasculaire complexifie le calcul du potentiel de liaison (Binding Potential BP) faute d'une vraie zone de référence puisqu'il n'existe pas de zone tissulaire sans vascularisation, et donc dénuée d'expression de TSPO. Une pseudo-zone de référence peut être utilisée par défaut mais nécessite d'être validée pour chaque radiotraceur et pour chaque maladie ou modèle étudié.

5.2. Imagerie TEP de la TSPO en recherche clinique

En utilisant la TEP au ^{11}C -PK11195, certaines études ont montré une expression élevée de TSPO chez des patients atteints d'épilepsie avec encéphalite de Rasmussen (Banati *et al.* 1999) ou de dysplasie corticale focale (Butler *et al.* 2013). Récemment, Gershen *et al.* ont étudié des patients d'ELT en utilisant la TEP au ^{11}C -PBR28 (Gershen *et al.* 2015). Ils ont montré une fixation du ^{11}C -PBR28 plus élevée au niveau de l'hippocampe ipsilatéral et de la ZE qu'au niveau du controlatéral.

Le signal TSPO est également élevé dans des régions extratemporales suggérant que des signaux inflammatoires ne sont pas limités à la ZE.

En utilisant la TEP au ^{11}C -PK11195, Butler et al. ont cherché à mettre en évidence la relation entre le signal inflammatoire et la crise épileptique (Butler *et al.* 2016). Un patient atteint d'épilepsie du cortex frontal (IRM négative) a été imagé 36h après une crise et également lors d'une période sans crise. Comparé à un groupe de contrôles, l'analyse a montré une différence significative dans la région frontale correspondant à des symptômes cliniques du cortex frontal aux deux temps d'examen. Cependant, le signal post-crise était plus élevé que celui de la période sans crise. Ces résultats suggèrent que la crise épileptique pourrait créer de l'inflammation et, à son tour, l'inflammation pourrait aggraver les crises épileptiques.

Dans tous les cas, la lésion de SH, la crise épileptique et la neuroinflammation peuvent être reliées mais personne ne peut conclure actuellement sur relation causale précise entre elles. Cette question est complexe à résoudre puisque les patients ne consultent jamais durant la période silencieuse, et aucune donnée correspondant à cette phase précoce n'est disponible. C'est pourquoi de nombreuses études précliniques essayent de clarifier le rôle de la neuroinflammation impliquée dans la période d'épileptogénèse, dans le but de proposer un traitement neuroprotectif antiépileptique.

5.3. Imagerie TEP de la TSPO en recherche préclinique

De nombreux modèles ont été développés pour étudier les mécanismes physiopathologiques de l'épilepsie chez le petit animal. Chaque modèle présente des avantages et des limites en modélisant un des aspects de l'ELT observé chez l'homme. Dans ce manuscrit, nous ne décrirons que des modèles utilisés actuellement pour l'imagerie TEP de la TSPO.

Une première étude TEP essayant de déterminer si la TSPO est un biomarqueur de

l'épileptogénèse a été publiée en 2012 par l'équipe du Dr Dedeurwaerdere. Ces auteurs ont démontré pour la première fois la faisabilité de détection *in vivo* des signaux inflammatoires impliqués dans l'épileptogénèse induit par l'administration systémique d'acide kaïnique chez le rat. Cette étude a montré des intensités élevées de ^{18}F -PBR111 dans l'ensemble du système limbique 7 jours après induction du modèle (Dedeurwaerdere *et al.* 2012).

Trois ans plus tard, cette équipe a décrit l'évolution temporelle du signal TSPO par l'autoradiographie *in vitro* avec du ^3H -PK11195 chez le même modèle (Amhaoul *et al.* 2015). L'étude de la TSPO a été réalisée à 5 moments de la progression de la maladie : 2 jours (phase précoce), 1 et 2 semaines (épileptogénèse), 6 semaines (phase transitoire) et 3 mois (phase chronique). Elle a démontré à tous les moments une augmentation du binding spécifique de ^3H -PK11195 de manière reproductible au niveau du lobe temporal incluant les hippocampes, les amygdales, les cortex piriformes et entorhinaux. Cette augmentation a été observée de manière occasionnelle dans le corps calleux, le cortex pariétal, le thalamus et l'hypothalamus.

Ces signaux augmentent à partir de l'induction du modèle et parviennent à un pic 2 semaines après induction du modèle, puis diminuent au fil du temps. Durant la phase chronique, cette étude a aussi démontré une corrélation positive entre l'intensité du signal TSPO au niveau de l'hippocampe, du thalamus, des cortex piriforme et entorhinal et la fréquence des crises spontanées et récurrentes.

Une étude pilote *in vivo* de TEP au ^{18}F -PBR111 chez certains rats a aussi été réalisée pour montrer une fixation élevée de traceur *in vivo* jusqu'à 6 semaines après induction du modèle (Amhaoul *et al.* 2015).

En 2016, Brackhan *et al.* ont décrit en détail une évolution temporelle *in vivo* de la TSPO par la TEP au ^{11}C -PK11195 chez un modèle du rat où l'état de mal a été induit par l'administration systémique de pilocarpine (Brackhan *et al.* 2016). L'étude a été réalisée à de nombreux moments

après l'induction : immédiatement après l'état de mal, 1 jour, 2 jours, 5 jours, 7 jours, 14 jours, 22 jours et 14-16 semaines.

Le %ID/cc de ^{11}C -PK11195 a commencé à augmenter 2 jours après induction dans l'ensemble des régions impliquées dans l'épileptogénèse (hippocampe, amygdale, cortex piriforme et thalamus), a atteint un pic à 7 jours, puis a diminué au cours du temps pour revenir à l'état basal 4 mois après induction.

Cette équipe a également démontré que le %ID/cc de ^{11}C -PK11195 était stable au niveau du cervelet dans tous les examens. De ce fait, le potentiel de liaison a été calculé en utilisant la matière grise du cervelet comme la zone de référence. En utilisant le potentiel de liaison au lieu du %ID/cc, Brackhan et al. ont observé le pic de TSPO décalé à 14 jours après induction avec retour à l'état basal à 4 mois. La bonne corrélation entre le potentiel de liaison et le signal mesuré sur l'autoradiographie *in vitro* est la raison pour laquelle les auteurs suggèrent que le potentiel de liaison reflète mieux l'expression de la TSPO que le %ID/cc.

Ces deux études ont montré de manière concordante des signaux neuroinflammatoires élevés *in vivo* et aussi *in vitro* dans l'ensemble du système limbique, suggérant que la TSPO est un bon biomarqueur de l'épileptogénèse. Cependant, il est légitime de se demander si ce fort signal est réellement lié à l'épileptogénèse ou est un effet du toxique systémique qu'est l'acide kaïnique ou la pilocarpine. La disparition du signal inflammatoire durant la période chronique est aussi une autre limite de ces modèles puisque chez l'homme, le signal reste toujours élevé durant cette phase (Hirvonen *et al.* 2012).

D'autres études précliniques ont tenté d'évaluer la relation entre le signal TSPO et la fréquence des crises épileptiques. En 2014, l'équipe de Potschka a évalué cette relation en utilisant le modèle du rat avec état de mal induit par stimulations électriques locales au niveau de l'amygdale droit (Bogdanovic *et al.* 2014).

L'imagerie TEP au ^{11}C -PK11195 a été réalisée 8 semaines après induction chez 3 groupes : rats épileptiques non-répondant au phénobarbital (pharmacorésistants), rats épileptiques répondant au phénobarbital et rats contrôles. Aucune différence significative de captation de ^{11}C -PK11195 (%ID/cc) n'a été trouvée entre le groupe contrôle et celui répondant au phénobarbital.

Par contre, un signal élevé au niveau des hippocampes et du cortex pariéto-occipital a été observé chez le groupe des rats épileptiques pharmacorésistants. L'auteur conclut à une relation entre des signaux TEP au ^{11}C -PK11195 et la fréquence des crises épileptique et suggère que l'imagerie TEP de la TSPO est un bon marqueur de l'ELT pharmacorésistante.

Sur des coupes d'immunohistologie, l'auteur a aussi montré une accumulation des microglies activées associées à la mort neuronale au niveau des hippocampes des rats épileptiques répondant ou non-répondant au phénobarbital par rapport au groupe contrôle. Cependant, aucune différence significative de l'activation microgliale ainsi que de la mort neuronale n'a été trouvée entre le groupe répondant et non-répondant au traitement. L'auteur explique que l'activation microgliale retrouvée chez le groupe répondant au phénobarbital ne se traduit pas par un signal élevé sur la TEP du fait de la faible sensibilité du PK11195.

En effet, en utilisant un autre radiotraceur, le ^{18}F -GE-180, avec une affinité pour le TSPO plus élevée, cette même équipe en 2017 a confirmé une différence significative entre des rats épileptiques et des rats contrôles chez le même modèle du rat à 8 semaines post induction (Russmann *et al.* 2017).

Dans cette étude récente, cette équipe a ajouté 2 temps (à 2 et 4 semaines) d'acquisition correspondant à la période épileptogénèse. En utilisant le logiciel SPM, les auteurs ont montré une forte corrélation entre les signaux TEP de l'épileptogénèse et la fréquence des crises récurrentes à 8 semaines post induction. Les auteurs concluent qu'un fort signal inflammatoire de la région limbique durant la période d'épileptogénèse peut prédire la fréquence élevée des crises récurrentes au temps chronique.

Pour conclure, l'imagerie TEP de la TSPO est un outil important pour évaluer la

neuroinflammation impliquée dans l'épileptogénèse mais aussi pendant la période chronique caractérisée par la récurrence des crises d'épilepsie. Comme les modèle du rat entraînent souvent des lésions trop importantes, une lésion de SH atypique ainsi que des crises récurrentes non persistantes, nous avons choisi de travailler sur un autre modèle d'épilepsie chez la souris pour évaluer la neuroinflammation. Ce modèle, facile à mettre en place, reproduit une lésion de SH unilatérale très similaire à celle observée chez l'homme et accompagnée de crises récurrentes persistantes tout au long de la vie de la souris.

6. Objectifs de travail

Dans ma thèse, nous avons utilisé **le modèle d'EMT chez la souris** induit par injection intrahippocampique d'acide kaïnique (AK). En effet, ce modèle a été validé par plusieurs équipes comme pouvant présenter de grandes analogies avec la pathologie humaine pendant la période d'épileptogénèse et la période d'ictogénèse avec une SH typique et reproductible. La petite taille du cerveau de la souris explique probablement qu'aucune étude d'imagerie n'ait été encore réalisée chez ce modèle malgré l'intérêt potentiel.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse sont :

- de mettre en place le modèle et d'optimiser le protocole de l'imagerie TEP ^{18}F -DPA-714 chez la souris (chapitre 2),
- de déterminer la faisabilité de la TEP ^{18}F -DPA-714 longitudinale chez la souris (chapitre 3),
- de déterminer l'évolution du signal TSPO au cours de la constitution de la SH par une quantification simple (chapitre 3) et par des approches de quantification plus complexes (chapitre 4),
- de déterminer l'évolution des cellules gliales et ses relations avec la TSPO au cours de la constitution de la SH (chapitre 3).

Chapitre II. Mise au point du protocole d'étude d'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714 dans un modèle d'épilepsie avec SH chez la souris.

1. Introduction et objectifs

Les progrès de l'imagerie préclinique permettent de nos jours de remplacer des études *in vitro* par des approches *in vivo* en visualisant des processus biologiques à l'échelle des structures cérébrales chez la souris. Ces progrès donnent l'opportunité de réaliser des études longitudinales, c'est-à-dire de procéder à plusieurs scans répétés chez le même animal au cours du temps, pour caractériser les modifications entre état basal et état pathologique, accéder à la phase aigüe mais également à la phase chronique d'une maladie. Enfin, ces progrès permettent également de suivre *in vivo* l'effet d'un traitement au cours du temps.

De nombreuses modalités d'imagerie applicables aux rongeurs sont actuellement disponibles tel que : le micro-scanner, la micro-IRM, la micro-TEMP, la micro-TEP et l'imagerie hybride comme la micro-TEP-CT ou la micro TEP-IRM. Parmi ces modalités, la TEP est la méthodologie la plus sensible permettant une mesure quantifiable des mécanismes biologiques sous-jacents.

Cependant, pour obtenir une quantification fiable, il est indispensable d'étudier des facteurs influençant les résultats quantitatifs, notamment pour une étude longitudinale. L'analyse des paramètres d'imagerie tel que la modalité d'injection, les quantités injectées, les temps d'acquisition ont nécessité une attention particulière.

D'autre part, le modèle que nous avons choisi pour conduire cette étude a été développé par le Pr Bouilleret (Bouilleret *et al.* 1999) à Strasbourg. Le choix de ce modèle a été expliqué dans la **partie 2.2.3.2 du chapitre 1**. Une part importante de cette thèse a consisté à implémenter ce modèle à Orsay au sein du SHFJ.

Ce modèle est obtenu par injection intrahippocampique d'AK réalisée à l'aide d'une aiguille de diamètre le plus petit disponible afin de limiter la destruction mécanique du tissu. L'inflammation causée par le geste chirurgical a été évaluée chez des souris injectées seulement avec le sérum physiologique (souris témoin).

Cette première partie du travail avait donc deux objectifs:

- (i) Optimiser et standardiser des conditions expérimentales du protocole d'acquisition d'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714,
- (ii) Mettre en place le modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'AK chez la souris et comparer les signaux TEP au ^{18}F -DPA-714 observés au niveau des hippocampes chez des souris épileptiques et des souris témoins après la chirurgie.

2. Protocole d'étude

2.1. Protocole d'acquisition d'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714

Les acquisitions ont été réalisées chez des souris normales mâles C57Bl6 (Charles River, France) adultes (4 mois), considérées comme l'état basal, dans le but d'étudier les facteurs pouvant potentiellement influencer la quantification.

2.1.1. Conditions expérimentales

Les souris ont été hébergées aux conditions d'hébergement de l'animalerie du service SHFJ avec une alternance jour nuit de 12h et une régulation de la température. L'eau et la nourriture étaient à disposition des animaux sans restriction.

Le jour de l'examen, les animaux étaient transférés en salle d'imagerie et disposés dans une boîte chauffante au moins 30 minutes avant l'anesthésie et jusqu'au réveil complet après l'examen de façon à limiter les variations de température corporelle. Pour les phases d'imagerie, la dose de

l'anesthésique, l'isoflurane, était variable entre 1,5 à 2,5% pour assurer une fréquence respiratoire entre 80 à 120 fois par minute.

2.1.2. Voie d'injection

L'administration intraveineuse du traceur TEP doit être réalisée sous caméra de façon à suivre les phases précoces de distribution du traceur in vivo. Pour cela, le cathéter était préparé au préalable par fixation d'un microtubule PolyE 120 (PE20, Harvard Apparatus) de 18cm de longueur (20µl de volume mort) à une aiguille de 27G. L'air était chassé par injection de sérum physiologique à l'aide d'une seringue insuline (Terumo, 27G) rattachée à l'autre extrémité du microtubule (coté sans aiguille).

Pour la mise en place du cathéter, la queue de la souris était plongée dans l'eau chaude pendant environ 10 secondes pour dilater les veines. Ensuite, le cathéter était posé et fixé dans la veine latérale de la queue de la souris. 20 à 40 µl de sérum physiologique étaient poussés pour vérifier la bonne mise en place du cathéter (**Figure II-2-1**).



Figure II-2-1. Mise en place du cathéter chez la souris

2.1.3. Acquisition dynamique TEP au ^{18}F -DPA-714

L'acquisition a été réalisée sur la machine microTEP-CT (Inveon Siemens) (**Figure II-2-2**).



Figure II-2-2. Machine microTEP-CT (Inveon Siemens)

Ses caractéristiques sont résumés dans la **figure II-2-3**.

	Inveon Siemens	Mosaic HP Philips	ClearPET Raytest	Argus Sedecal	Genisys4 Sofie biosciences	NanoPET/CT Mediso	ALBIRA Bruker
Matériel de détecteur	LSO	LYSO	LYSO/LuYAP	LYSO/GSO LYSO/GSO	BGO	LYSO	LYSO monolithic
Dimension de cristal (mm ²)	1.51 × 1.51 × 10	2 × 2 × 10	2 × 2 × 10+ 2 × 2 × 10	1.45 × 1.45 × 7 (LYSO); 1.45 × 1.45 × 8 (GSO)	1.8 × 1.8 × 7	1.12 × 1.12 × 13	40 × 40 × 10
Diamètre d'anneau (mm)	161	197	135–225	118	50+	181	111
CDV axial (mm)	127	119	110	48	94	94.8	40
Fenêtre d'énergie (keV)	350–625	385–665	250–650	250–700	150–650	250–750	350–650
Efficacité de détection (%)	6.72	2.83	3.03	4.32	14	7.7	2
Résolution transaxiale à 5 mm (mm)	1.64	2.34	2.02	1.66	1.4*	~1.6	1.55*

Figure II-2-3. Caractéristiques des machines microTEP adapté de (Kuntner & Stout 2014).

CDV (champ de vue). * : résolution spatiale transaxiale au centre du CDV. La microTEP Inveon

Siemens possède une résolution spatiale de **1,5 mm** au centre du CDV et de **1,6 mm** à 5 mm décalé du centre du CDV (Visser *et al.* 2009).

La souris était posée en décubitus ventral sur le lit avec la tête au centre du champ de vue repéré à l'aide d'un laser de positionnement. La souris était bien fixée sur le lit pour éviter tout mouvement pendant l'examen. La seringue de liquide physiologique était remplacée par une seringue contenant une quantité connue de traceur, puis fixée à une pompe d'injection automatique (Pump Pico Plus Elite, Harvard Apparatus) (**Figure II-2-4**).

Une seringue de ^{18}F -DPA-714 de 120 μl de volume était préparée, connectée au microtubule de 20 μl de volume mort décrit au-dessus, et pilotée par la pompe automatique. L'acquisition était démarrée et l'injection réalisée 20 secondes plus tard pendant une minute avec une vitesse d'injection constante (120 $\mu\text{l}/\text{min}$). Après 60 minutes d'acquisition, le cathéter était retiré et l'activité résiduelle dans la seringue vide était mesurée. L'activité injectée était calculée à partir de l'activité mesurée dans la seringue remplie et l'activité résiduelle avec prise en compte de la correction de décroissance radioactive.

Suite à l'acquisition TEP, 5 minutes d'acquisition tomодensitométrique (80kV/500 μA) étaient systématiquement réalisées afin d'obtenir une image anatomique permettant le calcul de la carte d'atténuation nécessaire à la reconstruction d'images TEP quantitatives.

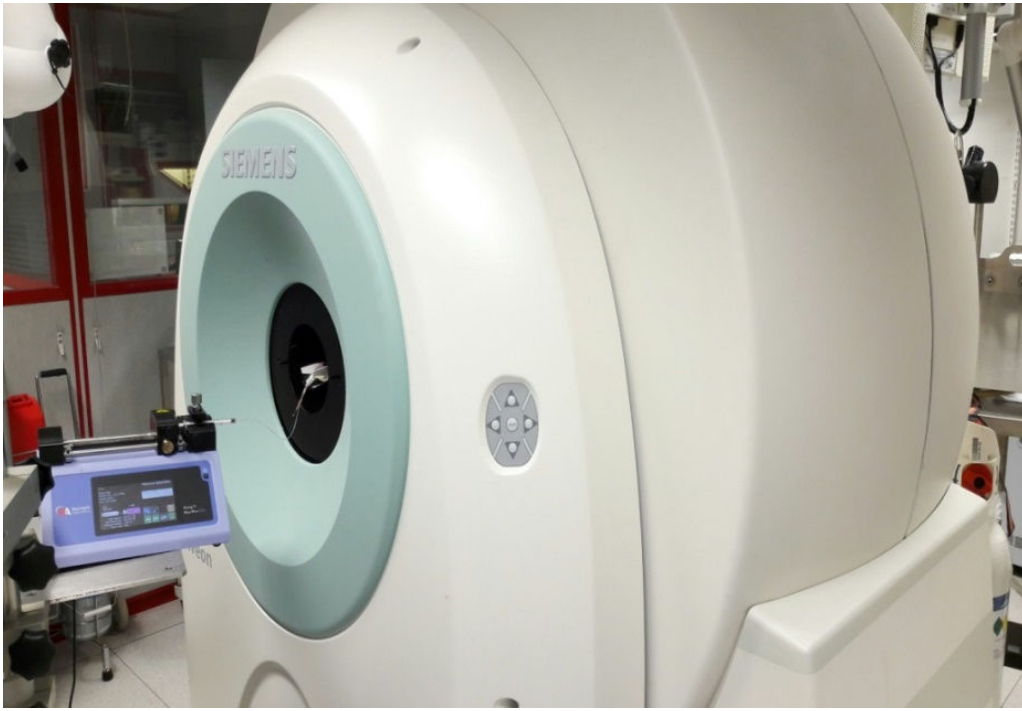


Figure II-2-4. Visualisation de la pompe d'injection à l'arrière du microTEP-CT

2.1.4. Reconstruction d'images

Les données TEP acquises ont été stockées en mode-événementiel (list-mode en anglais), puis ordonnées en 24 sinogrammes de 3x30s, 5x60s, 5x120s, 3x180s, 3x240s, 4x300s et 1x150s. Les images ont été reconstruites par l'algorithme itératif 2D OSEM (4 itérations, 16 sous-ensembles) sans post-filtrage (taille de voxel = 0,4mm x 0,4mm x 0,8mm). Les images ont été corrigées de l'atténuation, du temps-mort, de la normalisation, des coïncidences fortuites (Chow *et al.* 2005) et de la diffusion (Watson 2000).

2.1.5. Traitement d'images

Le traitement d'images a été réalisé en utilisant le logiciel Pmod 3.6 (PMOD Technologies, Suisse). Les images TEP étaient automatiquement recalées aux images du scanner (iterative rigid matching).

Ensuite, les contours des images de scanner obtenus par seuillage constant (entre 100 et 1000 de niveau de gris du scanner) étaient manuellement recalés à un atlas IRM (Mirrione atlas) (Ma *et al.* 2005). Cet atlas est obtenu à partir d'une déformation minimum de 10 souris mâles C57Bl/6 (12-14 semaines, 25-30g) qui correspond à des souris utilisées dans notre étude. Cet atlas a été également utilisé dans plus d'une centaine de publication chez la souris (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/16165303/citedby/?tool=pubmed>).

Une combinaison de deux transformations (TEP à scanner, puis scanner à IRM) a été utilisée pour superposer les images TEP à l'atlas IRM. Grâce à cet atlas, des régions d'intérêt (ROI) étaient automatiquement déterminées : hippocampes, extrahippocampes (cortex,

amygdales, thalamus, striatum) et cervelet. La fixation de ^{18}F -DPA-714 de chaque région était intégrée sur 60 minutes et exprimée en pourcentage de dose injectée par centimètre cube (%ID/cc).

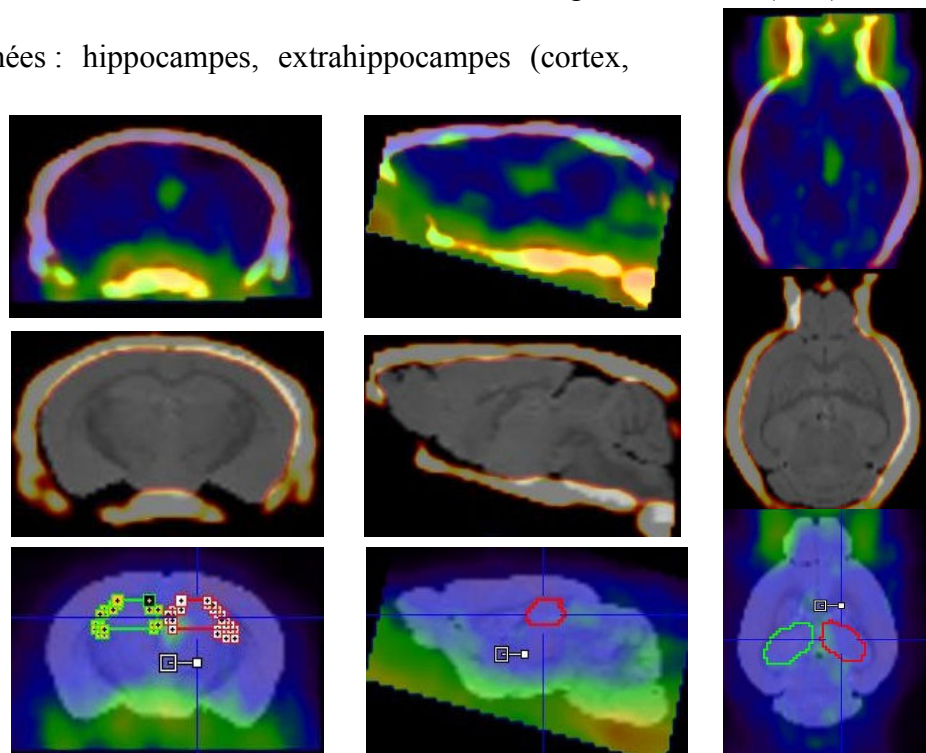
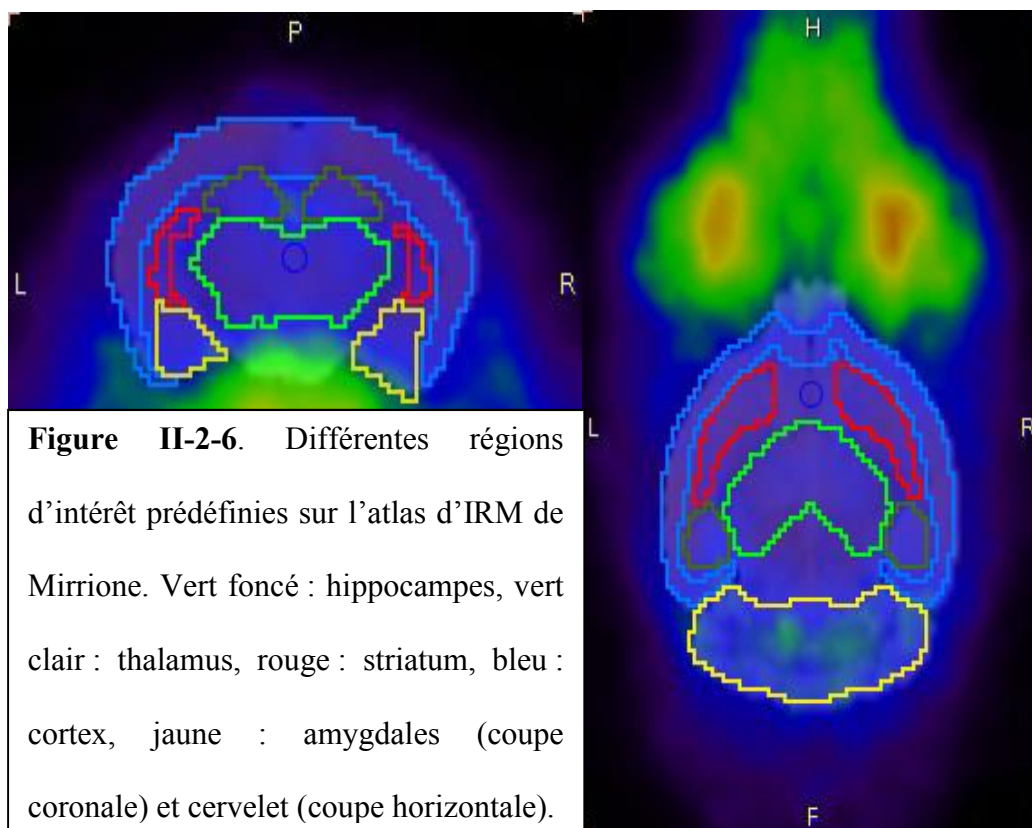


Figure II-2-5. Recalage entre l'image TEP et l'atlas IRM à l'aide du scanner.

La première étape est un recalage automatique entre la TEP et le scanner; puis la deuxième étape un recalage manuel entre le scanner et l'IRM. De la combinaison de deux étapes résulte en une image TEP-IRM superposée. Les régions d'intérêt tracées sur l'image anatomique de l'IRM peuvent donc être positionnées sur l'image TEP afin de quantifier le signal au niveau des hippocampes ; rouge : région d'intérêt de l'hippocampe droit et vert : région d'intérêt de l'hippocampe gauche.



2.2. Modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'AK chez la souris

2.2.1. Protocole d'injection intrahippocampique d'AK chez la souris

Les souris ont été anesthésiées sous isoflurane 4% dans une boîte d'induction puis positionnées dans un cadre stéréotaxique. L'injection a été réalisée au niveau de l'hippocampe dorsal droit (coordonnées par rapport au bregma : antéropostérieur -1,8 mm ; médiolatéral -1,6 mm et dorsoventral -1,8 mm). L'AK dissout dans le sérum physiologique (50 nl, 0,2 µg) a été injecté

pendant une 1 minute à l'aide d'une pompe automatique (World Precision Instruments) en utilisant une microseringue Hamilton de 10µl équipée d'une aiguille adaptée. Après injection, l'aiguille a été maintenue *in situ* pendant une minute pour éviter le reflux sur le trajet d'injection. La validation du modèle a été faite dans premier temps par le Pr. Bouilleret sur l'analyse des comportements des souris pendant 2 heures post injection (présence de signe de crise d'immobilité, d'agitation) et sur les dommages histologiques (Crésyl Violet) observés à 7 jours après injection.

2.2.2. Choix de l'aiguille pour induire le modèle

De façon à provoquer le moins possible de lésion mécanique tout en conservant une bonne répétabilité de la procédure d'injection, nous avons testé plusieurs modèles. Les modèles conventionnels utilisés chez le rat au laboratoire ne nous satisfaisant pas en raison de la grande taille de l'aiguille (25G, 0,5mm de diamètre externe), nous nous sommes procurés des aiguilles particulières. Nous disposions d'une aiguille commercialisée de 30G (Hamilton) (0,3mm de diamètre externe) (numéro I) (Figure 2.4) et d'une aiguille fabriquée à façon par la société PHYMEP avec diamètre externe d'une moitié de celui de l'aiguille Hamilton 30G (numéro 2) (Figure 2.4).

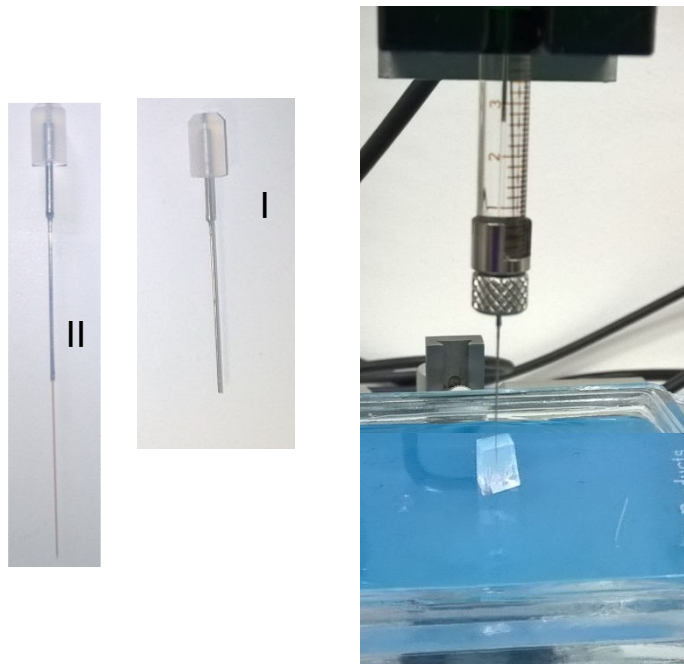


Figure II-2-7. Validation des dispositifs d'injection aiguille I Hamilton, aiguille II Phymep.

Pour vérifier si 50 nl de volume étaient précisément déposé dans le tissu cérébral, nous avons simulé une injection de radiotracer dans un tissu mou. Pour cela, du ^{18}F -FDG a été injecté dans de petits blocs de gel d'agarose (3%) en utilisant ces deux aiguilles avec le même protocole que celui

utilisé pour l'induction du modèle (**Figure II-2-7**). Pour chaque aiguille, l'injection a été répétée dix fois, chaque gel d'agarose injecté a été mis dans un tube et quatre tubes contrôles contenant 5 µl de ^{18}F -FDG prélevés par une pipette calibrée ont également été préparés. L'activité de chaque tube a été mesurée à l'aide d'un compteur de type Cobra. Pour chaque aiguille, la moyenne de l'activité des 10 tubes d'agarose injectés a été comparée à celle des 4 tubes de contrôle (activité de tube de contrôle étant divisée par 100 pour comparer avec 50 nl injecté dans le gel d'agarose).

2.2.3. TEP au ^{18}F -DPA-714 chez des souris à 7 jours après injection d'AK ou de sérum physiologique

L'acquisition dynamique de 1 heure a été réalisée chez 5 souris épileptiques à 7 jours post induction et chez 5 souris témoins suivant le protocole TEP au ^{18}F -DPA714 décrit ci-dessus.

2.2.4. Autoradiographie in vitro au ^{18}F -DPA-714

Dès la fin de l'acquisition TEP au ^{18}F -DPA714, les souris ont été perfusées par voie intracardiaque. La perfusion du cerveau par voie intracardiaque est obtenue par incision de l'oreillette droite suivie d'une injection manuelle de sérum physiologique intraventriculaire gauche à l'aide d'un cathéter de 23 G.

Après décapitation, les cerveaux ont été délicatement retirés de la boîte crânienne, puis congelés dans de l'isopentane à -40°C . Les cerveaux congelés ont été stockés dans le congélateur à -80°C en attente de réaliser les coupes à l'aide d'un Cryostat (Leica CM3050).

Les cerveaux ont été coupés en tranche de 10 µm d'épaisseur dans la région de l'hippocampe : -1,34 mm, -1,58 mm, -1,82 mm (hippocampe dorsal) et -2,3 mm, -2,7 mm, -3,28 mm (hippocampe ventral) par rapport au bregma (Paxinos & Franklin 2001) et montés sur des lames de type Superfrost à raison de 6 coupes par lame.

Des lames de coupe du cerveau ont été incubées dans un tampon Tris-HCl contenant 37 MBq de ^{18}F -DPA-714 pendant 20 minutes à 4°C. Elles ont ensuite été lavées deux fois pendant 2 minutes dans un tampon Tris-HCl 50mM (pH = 7,4) à 4°C. Après une immersion rapide dans de l'eau distillée à 4°, les lames ont été séchées.

L'autoradiographie a ensuite été obtenue en exposant les lames contre un écran sensible aux rayonnements (Molecular Dynamics) pendant 24h, placées dans une cassette à température ambiante. L'écran a été lu à l'aide d'un scanner Storm (Molecular Dynamics). Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ.

3. Résultats

3.1. TEP au ^{18}F -DPA-714 chez des souris C57Bl6 normales, état basal

La quantification des signaux TEP (**figure II-3-1**) au niveau des hippocampes droits et gauches de souris contrôles montre que le signal TEP ne peut être détectable qu'à partir de 30 secondes après le démarrage de l'acquisition. On observe un pic de captation dès la 2^{ème} minute, suivi d'une courbe plutôt stable entre 2^{ème} et 10^{ème} minutes, puis une diminution entre les 10^{ème} et 50^{ème} minutes, qui tend à ralentir à partir 50^{ème} minute.

La captation est identique entre l'hippocampe droit et gauche chez l'ensemble des animaux. Ces courbes sont issues de la quantification des hippocampes de 8 souris montrant ainsi une bonne reproductibilité des résultats obtenus avec le protocole d'imagerie mis en place.

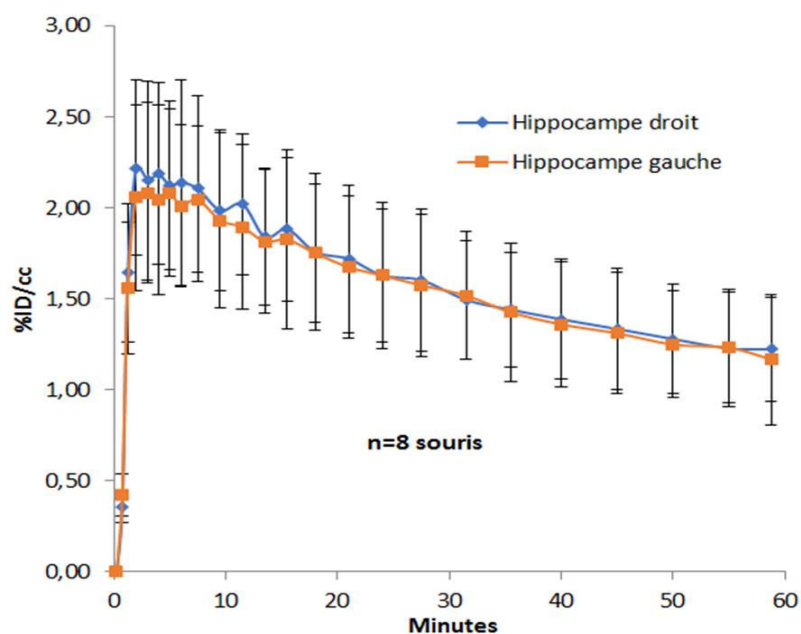


Figure II-3-1. Cinétique de captation du ^{18}F -DPA-714 dans les hippocampes des souris normales

A titre de comparaison, la **figure II-3-2** montre l'évolution du signal ^{18}F -DPA-714 au niveau des hippocampes chez une souris où l'injection n'était pas bien dans la veine. Le pic du signal est bas et décalé dans le temps en comparaison aux courbes visualisées en figure 2.5.

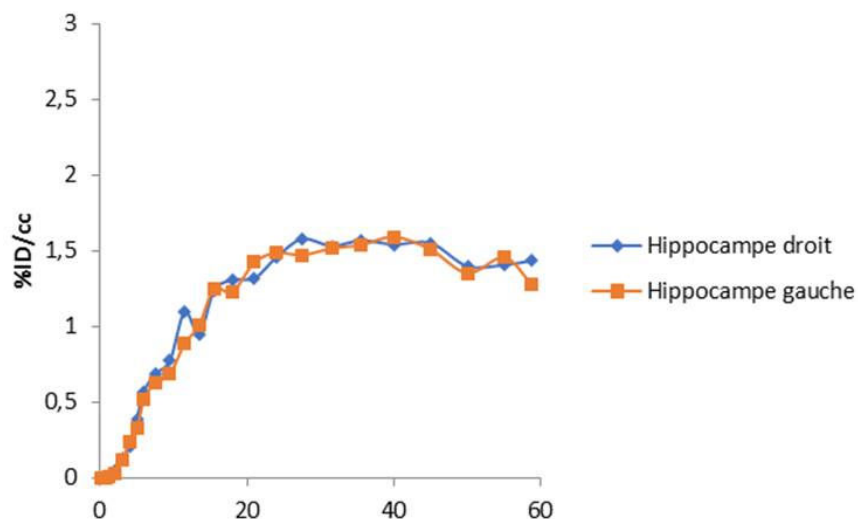


Figure II-3-2. Cinétique de captation du ^{18}F -DPA-714 dans les hippocampes d'une souris normale lorsque l'injection n'était pas bien dans la veine.

Un autre exemple démontrant l'importance de la définition des paramètres d'acquisition est illustré sur la figure suivante (**figure II-3-3**). Elle montre qu'un mouvement de l'animal entre la TEP et le scanner peut induire un recalage erroné.

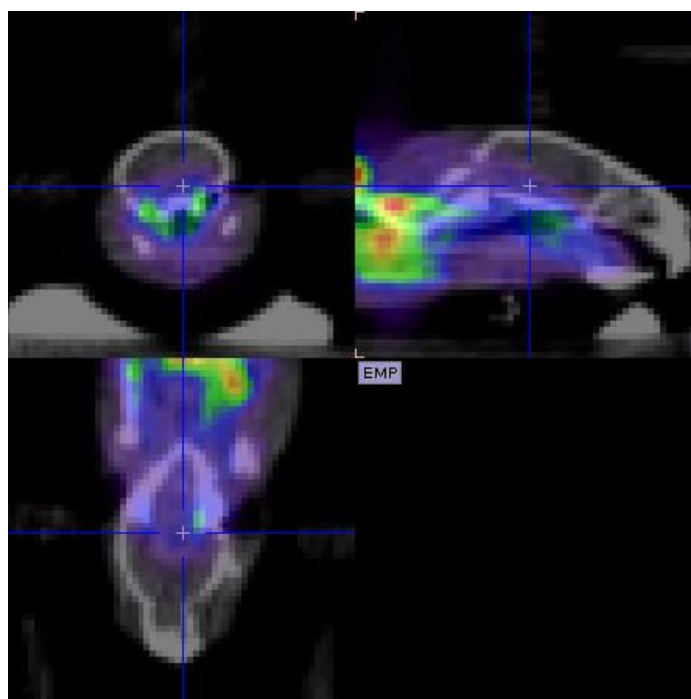


Figure II-3-3. Mouvement de l'animal entre la TEP et le scanner

3.2. Choix de l'aiguille pour induire le modèle

La **figure II-3-4** montre que l'aiguille II ne dépose pas précisément 50 nl de volume, ce qui se traduit par une faible activité injectée.

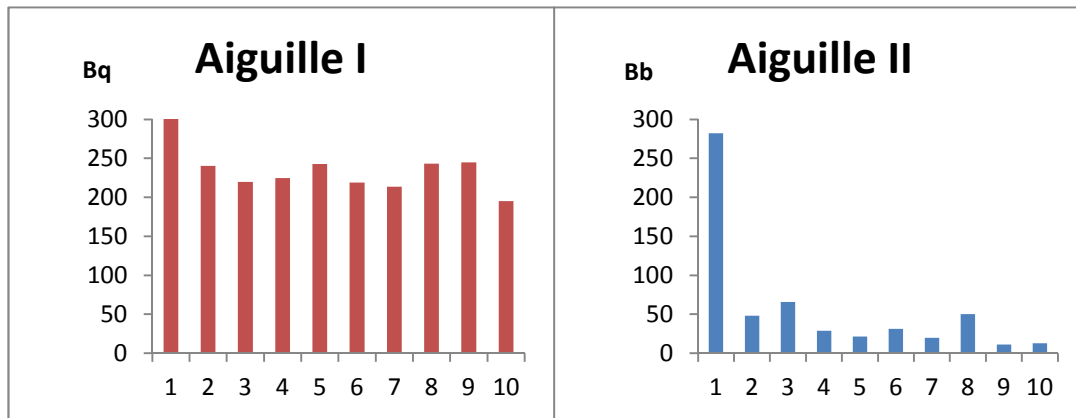


Figure II-3-4. Répartition de l'activité injectée de chaque l'aiguille.

Il n'y a pas de différence significative entre la moyenne de l'activité injectée au moyen de l'aiguille I et les valeurs attendues obtenues par pipetage du ^{18}F -FDG alors que les valeurs obtenues pour les injections au moyen de l'aiguille II sont plus faibles que les valeurs contrôles (**tableau II-3-1**).

Tableau II-3-1. Moyenne et écart-type de l'activité injectée au moyen de chaque aiguille.

Aiguille	Tube du gel d'agarose (10)	
	Moyenne	Ecart-type
I	234	28
II	87	81
	Tube de contrôle (4)	
	262	51

3.3. Modèle induit par injection intra hippocampique d'AK avec l'aiguille I

Des comportements anormaux (**figure II-3-5**) ont été observés chez toutes les souris pendant les 2 heures après injection tels que : immobilisme prolongé (**A**), mâchonnement avec salivation, rotations (**B**), mouvement clonique des pattes et chute (**C**). Certaines souris ont présenté des crises

généralisées importantes (**D**) ayant entraîné la mort de l'animal. Le taux de mortalité constaté était de 15 à 20%.

L'effet de l'AK sur les souris peut également être observé par analyses histologiques telles que décrites dans la littérature (Bouilleret *et al.* 1999). La **figure II-3-6** montre un aspect pycnotique des cellules de la couche CA1 et CA4 du côté droit à 7 jours après injection validant la procédure d'injection d'AK. Des cellules du côté gauche sont à ce stade généralement préservées.

L'étude par imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714 permet également de caractériser l'effet de l'injection de KA. Les images TEP présentées dans la **figure II-3-7** montrent un fort signal lié la fixation du ^{18}F -DPA-714 au niveau de l'hippocampe droit des souris épileptiques par rapport à celui des souris témoins obtenues par injection de sérum physiologique. Cette comparaison montre que l'effet mécanique de l'aiguille et du geste chirurgical est beaucoup moins important que celui d'AK.

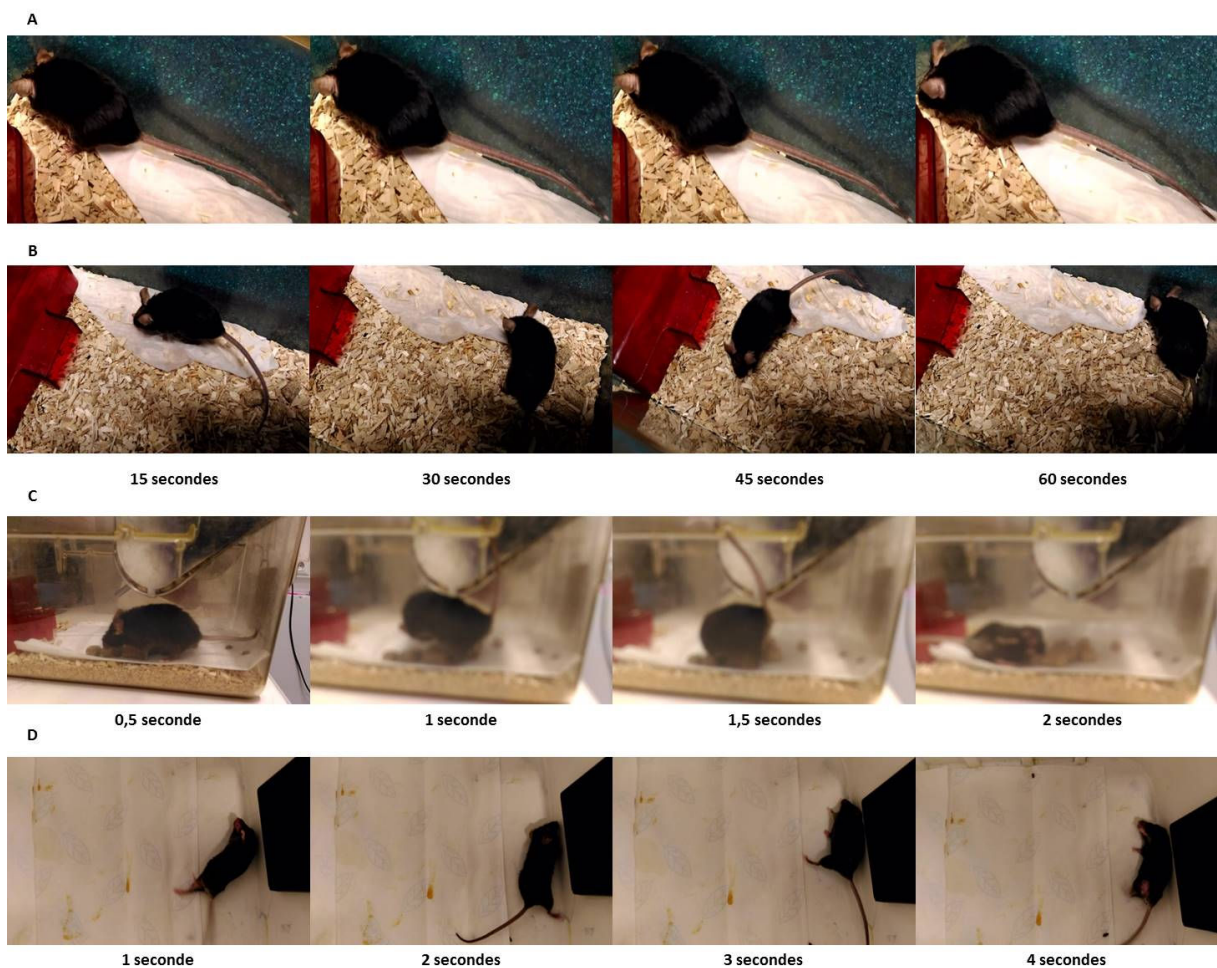


Figure II-3-5. Comportements anormaux après injection d'AK : (A) immobilisation pendant une minute, (B) rotations, (C) chute rapide, (D) crises généralisées.

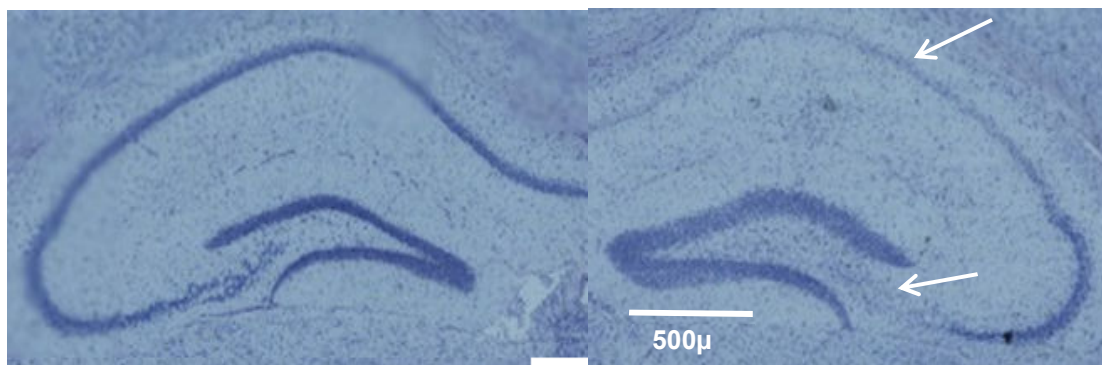


Figure II-3-6. Coloration au violet de crésyl 7 jours après injection d'AK : aspect pycnotique des cellules de la couche CA1 et CA4 du côté droit (flèches).

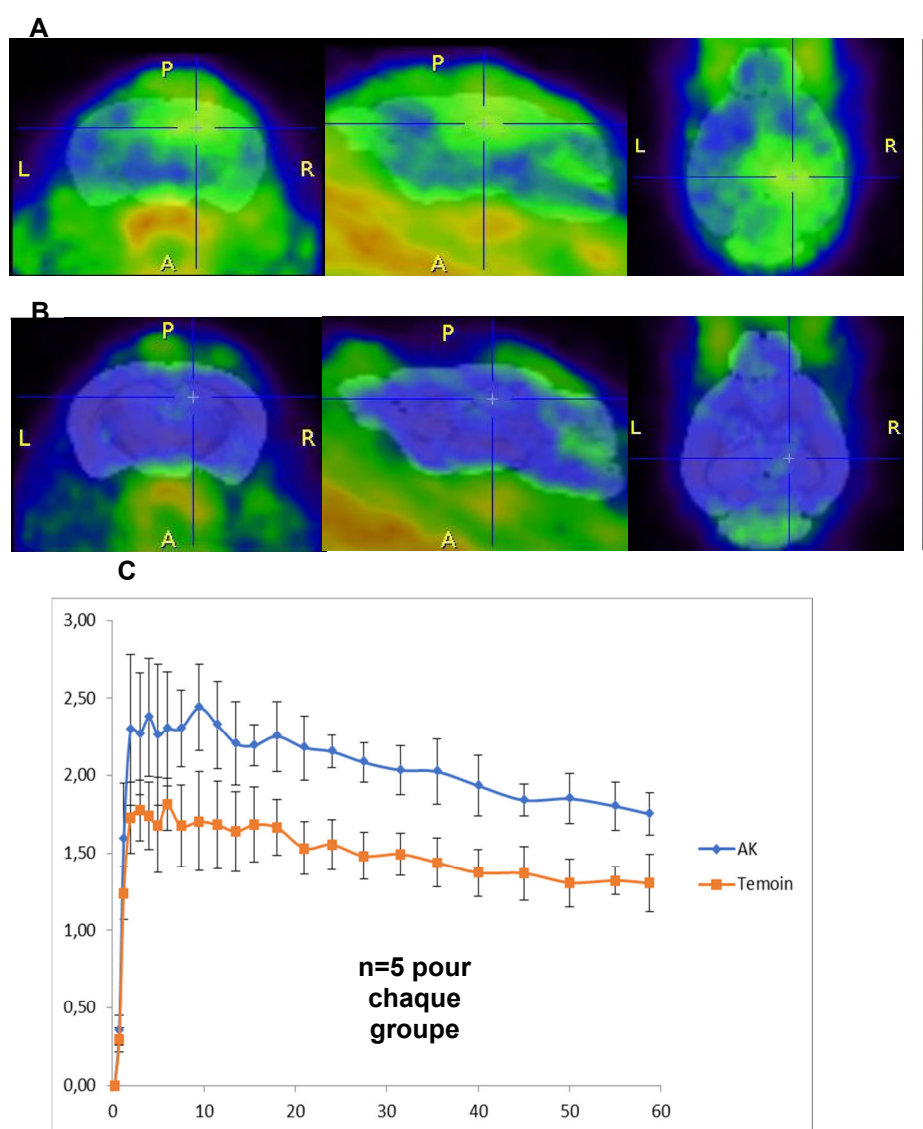


Figure II-3-7. TEP au ^{18}F -DPA-714 de souris AK (A) versus souris témoin (B) 7 jours après injection. (C) : courbe de temps-activité des souris AK et de témoins (moyenne et écart-type).

L'observation des images d'autoradiographie à 7 jours (**figure II-3-8**) après d'injection d'AK (A) confirme le fort signal inflammatoire au niveau de l'hippocampe injecté. Ce signal n'est pas limité au niveau dorsal mais est aussi visible jusqu'au niveau ventral. Au contraire, la fixation de ^{18}F -DPA-714 chez les animaux témoins est limitée à la zone d'injection et plus précisément au niveau du trajet de l'aiguille (B).

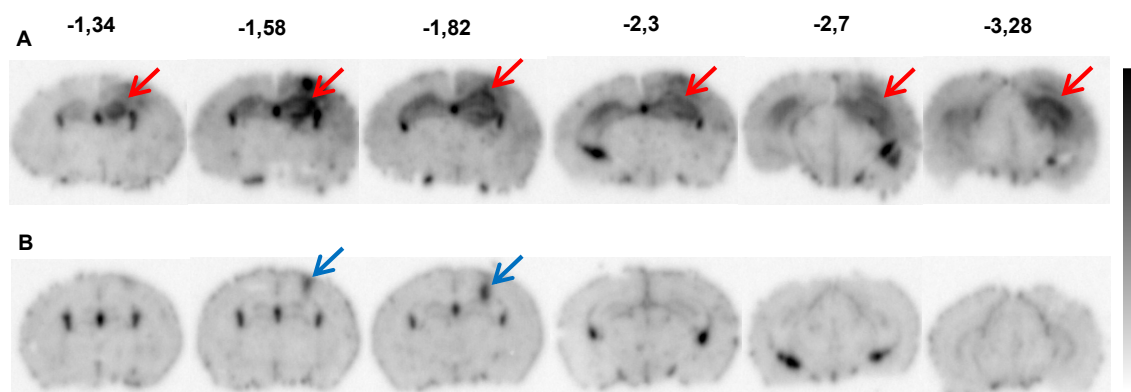


Figure II-3-8. Autoradiographie au ^{18}F -DPA-714 de souris AK (A) versus souris témoins (B) à 7 jours après injection. Les flèches rouges montrent des lésions après injection d'AK et les flèches bleues montrent le trajet de l'aiguille après injection de sérum physiologique. La numérotation des coupes correspond aux différents niveaux repérés sur l'atlas de Paxinos (Paxinos & Franklin 2001), où -1,8 correspond au niveau d'injection.

4. Discussion

4.1. Facteurs influant potentiellement la quantification du ^{18}F -DPA-714

4.1.1. Conditions expérimentales

Bien que notre étude soit réalisée sur la même souche de souris (C57Bl6), le même sexe (souris mâles) et le même âge (4 mois), une variabilité biologique pourrait être observée, de l'ordre de 15-20%, comme précédemment rapporté (Hussey et al. 1998), (Eckelman *et al.* 2007). Ainsi, notre protocole d'étude longitudinale doit favoriser les comparaisons d'observations effectuées à

différents moments post-induction à l'état basal de la même souris pour s'affranchir de la variabilité inter-sujet. De plus, pour l'ensemble des phases d'expérimentations, il est important d'observer toujours les mêmes conditions expérimentales : conditions d'hébergement de l'animalerie, d'anesthésie, de température, d'induction du modèle, d'imagerie et d'analyse de données.

Les animaux ont été hébergés dans les conditions d'hébergement de l'animalerie du SHFJ. Les animaux ont eu un accès illimité à l'eau et à la nourriture même les jours d'imagerie. Ce n'est généralement pas dans le cas pour les examens au ^{18}F -FDG car le métabolisme glucidique peut être altéré par la glycémie alors que l'état de jeûne n'est pas nécessaire avant un examen TEP au ^{18}F -DPA-714.

Une anesthésie générale est obligatoire pour rendre les souris immobiles et minimiser le stress pendant l'acquisition d'images TEP. La dose d'anesthésique doit être maintenue la plus basse possible pour ne pas perturber l'état physiologique de l'animal tout en étant suffisante pour assurer l'anesthésie de la souris. Une dose d'anesthésique trop élevée peut tuer la souris après 60 minutes d'acquisition. Dans notre étude, la dose d'isoflurane varie souvent entre 1,5 à 2,5% pour assurer une fréquence respiratoire entre 80 et 120 fois par minute.

Une étude récente a illustré que le signal TEP peut être modifié en fonction de l'animal, du radiotraceur utilisé ou de l'agent anesthésique (Kuntner et al., 2014). L'isoflurane peut diminuer la captation de ^{18}F -FDG ou augmenter la liaison à ^{11}C -Raclopride mais aucune étude n'a été réalisée pour évaluer la relation entre fixation du ^{18}F -DPA-714 et l'isoflurane. Une étude *in vitro* a montré qu'une anesthésie avec 3% de sevoflurane 2 heures par jour pendant 3 jours peut entraîner la neuroinflammation avec une augmentation des interleukines (IL-6 par exemple) chez des souris néonatales (âge d'une semaine) mais pas chez des souris adultes (8 semaines) (Shen *et al.* 2013).

Il est aussi facile d'imaginer qu'une anesthésie trop profonde peut modifier le rythme cardiaque et la perfusion tissulaire induisant ainsi des variations importantes de la distribution du traceur dans l'organisme (fonction d'entrée). Pour ces raisons, un contrôle de l'intensité de l'anesthésie est indispensable à la conduite d'une telle étude.

Le contrôle de la température corporelle des animaux est important lorsque les souris sont anesthésiées. En effet, sous anesthésie, la température interne des rongeurs s'équilibre rapidement avec celle de la surface sur laquelle ils sont posés (Suckow *et al.* 2009). Ainsi, les animaux deviennent hypothermiques ce qui modifie leur état physiologique, pouvant conduire à la mort dans les cas extrêmes, mais modifie aussi leur métabolisme ainsi que les paramètres de perfusion tissulaire. C'est la raison pour laquelle la température du tapis chauffant doit être systématiquement vérifiée (37°C) avant de démarrer l'examen.

4.1.2. Voie d'injection

Trois principales méthodes peuvent être utilisées pour administrer le radiotraceur chez des rongeurs : la voie intrapéritonéale, la voie rétro-orbitaire et la voie intraveineuse. Seule, la voie intraveineuse est compatible avec une acquisition dynamique et permet d'étudier la pharmacocinétique du traceur. L'administration est souvent réalisée par la veine latérale de la queue. La taille de l'aiguille recommandée est entre 26G et 28G. Le volume injecté pour limiter la surcharge volumique est d'environ de 5ml/kg pour la souris (Diehl *et al.* 2001). Ainsi, pour une souris de 30 g, il ne faut pas dépasser 150µl de volume injecté.

Deux techniques différentes sont disponibles pour la voie intraveineuse. Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients (Vines *et al.* 2011). Une injection directe à la seringue est simple à réaliser et pratique pour une acquisition statique. Le volume mort de la seringue est quasiment nul, et cette approche limite les possibles problèmes de bulle d'air et d'activité résiduelle dans la

seringue. Cependant, l'inconvénient réside dans le fait que le manipulateur ne peut pas vérifier si l'aiguille est bien positionnée dans la veine avant injection. Ainsi, si une petite quantité de traceur est dans l'espace interstitiel, la quantification est potentiellement erronée. Il s'agit d'un aspect pratique important, tout particulièrement dans une étude longitudinale chez des souris C57Bl6, dont les veines caudales sont petites et fragiles.

L'autre technique consiste en une injection indirecte via un microtubule en polyéthylène préposition dans la veine caudale de l'animal. Cette technique est complexe en raison d'un volume mort important créé par le microtubule. Ainsi, il faut être extrêmement vigilant lors d'un remplacement de la seringue de sérum physiologique par la seringue radioactive parce que de l'air peut entrer dans le microtubule au moment du changement. Une grande bulle d'air entrant dans la veine peut tuer la souris par embolie pulmonaire pendant l'examen. De plus, pour calculer l'activité injectée précise, il est nécessaire de mesurer l'activité résiduelle dans l'ensemble du système d'injection (aiguille, microtubule et seringue).

Notre but était de minimiser au mieux le volume mort. Il n'existe pas actuellement de cathéter commercialisé avec aiguille de taille appropriée pour la veine de la souris comme dans le cas du rat. Nous avons donc d'abord utilisé une aiguille papillon de 27G (Vygon) mais un grand volume mort (150µl) résultant du grand diamètre interne du tubule (0.8mm) et de sa longueur de 300mm rendait la manipulation difficile.

Un nouveau cathéter a donc été fabriqué au laboratoire par fixer cette aiguille de 27G (Vygon) à un microtubule de diamètre interne (0,38mm) (PE20, Harvard Apparatus) compatible à cette taille d'aiguille. L'autre alternative disponible en terme de microtubule est le PE10 de diamètre interne de 0.28mm mais compatible à l'aiguille de 30G. Cette fabrication rend le contrôle du volume mort plus souple en modifiant la longueur du microtubule. Un petit volume mort est préféré mais la longueur du microtubule doit rester assez longue pour avoir suffisamment d'espace en manipulant. Un

microtubule trop court rend plus difficile la mise en place de la seringue sur la pompe comme montrée dans la **figure II-2-4**. Nous avons adopté une longueur de 180 mm pour avoir un volume mort de 20µl qui est parfaitement compatible avec notre protocole d'acquisition.

4.1.3. Acquisition dynamique de 60 minutes

Bien que l'acquisition dynamique soit laborieuse (pose de cathéter, plus long est le temps d'acquisition, plus grand est le risque que la souris meurt, limite de nombre de souris imagées par jour), elle donne accès à un plus grand choix de méthodes de quantification des images. En effet, la fixation peut être calculée pour n'importe quel intervalle de temps grâce à l'acquisition en mode séquentiel. Ainsi, par exemple, le %ID/cc peut être calculé sur l'ensemble des 60 minutes pour maximiser le rapport signal sur bruit ou sur les 10 dernières minutes correspondant à la période durant laquelle le signal est plus stable (**figure II-3-1**).

Le %ID/cc est un paramètre semi-quantitatif utile pour comparer différents examens mais qui ne reflète pas une information biologique spécifique. Cependant, une acquisition dynamique de 60 minutes permet de faire de la modélisation cinétique pour mesurer des paramètres plus pertinents tels que le volume de distribution ou le potentiel de liaison. Vicidomini et al. ont également validé le fait qu'une durée de 60 minutes était adaptée pour l'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714 chez la souris C57Bl6 (Vicidomini *et al.* 2015). En effet, cette équipe a démontré une haute liaison spécifique du radiotraceur inchangé à la TSPO et une absence de radiométabolite dans le cerveau à 60 minutes après injection du radiotraceur.

La modélisation cinétique de traceurs ciblant la TSPO à partir d'acquisitions réalisées chez la souris est encore loin d'être aisée en raison notamment de l'absence d'une région de référence ou de la difficulté à mesurer la fonction d'entrée chez la souris. Ces difficultés sont détaillées dans le

chapitre 4 consacré à une étude de modélisation et quantification plus sophistiquées. C'est la raison pour laquelle la quantification au moyen du %ID/cc est l'approche la plus fréquemment utilisée dans des études TEP ciblant la TSPO chez les souris. La standardisation des conditions expérimentales nous a cependant donné la possibilité de réaliser des analyses cinétiques plus complexes, qui seront également présentées dans le **chapitre 4**.

Parmi les paramètres importants à contrôler pour exploiter les mesures dynamiques, la méthode d'injection du traceur et le contrôle de l'activité injectée sont cruciaux. L'injection en masse demande un calcul rigoureux prenant en compte la radioactivité spécifique (RAS) disponible le jour de l'examen. Comme la RAS décroît au cours du temps (période de 110 minutes pour fluor-18) et que la durée moyenne d'un examen est d'environ 75 minutes (60 minutes de TEP + 5 minutes de scanner et plus ou moins 10 minutes de préparation), à la fin du 3^{ème} examen réalisé le même jour à partir de la même radiosynthèse, 2 périodes de décroissance se sont déjà écoulées. Ainsi, la dose injectée doit être diminuée d'un facteur 4 chez le 4^{ème} animal par rapport au premier si l'on veut avoir la même masse injectée. Une dose injectée si faible aboutit à la diminution inacceptable de la qualité d'image. En fonction de la RAS, nous avons donc réalisé au maximum 3 examens par jour pour assurer une masse injectée faible et stable entre différents examens.

Cette masse injectée n'est pas un élément critique dans les études réalisées chez l'homme mais constitue un problème important dans des études *in vivo* des récepteurs chez les rongeurs en raison de la relativement faible densité de récepteurs (Kuntner & Stout 2014). La masse injectée peut perturber la cinétique physiologique de liaison aux récepteurs et il est recommandé de ne pas dépasser 10% de l'occupation maximale des récepteurs dans des études *in vivo* de la cinétique de liaison (Hume *et al.* 1998). Maeda et al. ont démontré l'effet de la RAS en réalisant une étude avec une haute RAS de ¹¹C-PIB (~200GBq/μmol) chez des souris d'Alzheimer transgéniques. Une diminution de la RAS pour atteindre 20GBq/μmol a entraîné une diminution importante du rapport signal-sur-bruit et la diminution de la liaison dans l'hippocampe et le cortex, réduisant ainsi la

sensibilité de détection des plaques amyloïdes (Maeda *et al.* 2007).

De plus, une phase de perfusion bien contrôlée est nécessaire pour avoir un résultat reproductible entre différents examens (**figure II-3-1**).

4.1.4. Reconstruction d'images

En recherche, les images TEP ont été généralement stockées en list-mode. Les informations relatives à une coïncidence détectée (coordonnées spatiales et temporelles, énergies) sont sauvegardées en mémoire du processeur sous la forme d'une liste qui nécessite une grande taille de stockage mais peut être relue afin de reconstruire les images au moyen de différents algorithmes ou en utilisant des échantillonnages temporels différents.

Ces données brutes ont ensuite été converties soit en sinogramme 2D par recombinaison (rebinning) soit en sinogramme 3D. La profondeur d'interaction dans laquelle un événement d'annihilation se produit à l'intérieur des cristaux peut avoir un impact significatif sur la résolution spatiale de l'image, notamment pour le système préclinique avec petit diamètre d'anneau. Ainsi, le positionnement des événements d'angle oblique est important.

Dans notre protocole, a été appliqué un Fourier rebinning (FORE) dans lequel des coïncidences obliques ont été ordonnées dans une coupe transaxiale en utilisant la relation de fréquence-distance des données dans l'espace Fourier (Defrise *et al.* 1997). Le sinogramme 2D a été ensuite reconstruit par des algorithmes 2D conventionnels.

Les algorithmes de reconstruction 2D conventionnels incluent la méthode analytique de rétroprojection filtrée (FBP) ou les approches itératives, telles que l'OSEM 2D (ordered-subsets expectation-maximization). La méthode analytique est une méthode de référence en quantification

car elle n'introduit pas de biais. Cependant, en raison du diamètre de l'anneau de détecteur relativement petit et de la longueur du champ de vue axial, le système Inveon est plus enclin à la dégradation de résolution radiale et axiale dans le champ de vue, qui est mieux traitée par reconstruction itérative que par FPB (Bao *et al.* 2009). Ainsi, les images reconstruites par FORE suivi d'OSEM 2D avec des paramètres décrits dans notre protocole peuvent atteindre une résolution de 1,5 mm au centre du CDV (Visser *et al.* 2009). La reconstruction itérative évite également la présence d'artefacts de raies. En termes de quantification, récemment, en comparaison avec le FBP sur le système Inveon, (Yu *et al.* 2015) ont démontré que l'OSEM 2D donnaient des résultats robustes.

Pour obtenir des images TEP quantitatives, des corrections doivent obligatoirement être appliquées. La correction du temps mort et de la décroissance est généralement effectuée lors de l'acquisition des données. La normalisation, la correction de l'atténuation et de la diffusion sont implémentées dans la reconstruction itérative.

La correction de l'effet du volume partiel est nécessaire mais n'est pas obligatoire. Ce sujet sera discuté en détail dans le **chapitre 4**.

4.1.5. Traitement d'images

Notre étude utilise des images d'IRM pour le repérage anatomique des signaux inflammatoires révélés par la TEP. L'image anatomique aide aussi à tracer des régions d'intérêt au niveau de l'hippocampe lésé ainsi que dans les zones extrahippocampiques. Pour analyser les images dans ce chapitre et dans le chapitre suivant, nous utilisons l'atlas anatomique d'IRM de Mirrione disponible dans le logiciel Pmod qui a été utilisé par de nombreux auteurs et est simple à appliquer.

L'inconvénient de cet atlas commercialisé est qu'il est impossible de modifier les régions d'intérêt prédéfinies. Ainsi, nous ne pouvons pas découper la région du cortex en différentes zones qui nécessitent d'être distinguées pour l'étude de l'épilepsie (cortex frontal, cortex pariétal, cortex piriforme ou cortex entorhinal) ou réduire le volume de la région d'intérêt pour s'adapter aux petites lésions au niveau du thalamus ou de l'amygdale. Comme l'hippocampe sclérotique est atrophié, l'utilisation de l'atlas Pmod peut sous-estimer des signaux inflammatoires tardifs en raison d'un effet de volume partiel.

D'autres atlas existent également. L'impact de l'atlas sur la quantification sera rapporté dans le **chapitre 4**. Dans notre étude, le recalage de la TEP sur l'IRM a été fait à l'aide des contours du cerveau obtenu à partir du scanner. Tout mouvement important entre l'acquisition TEP et l'acquisition scanner est susceptible de compliquer l'étape de recalage automatique et même de fausser le résultat de quantification à cause d'une carte d'atténuation potentiellement mal alignée avec les données TEP. Il est obligatoire de bien fixer la souris pendant l'examen pour éviter les mouvements fortuits. Une fixation de la tête au moyen d'un cadre stéréotaxique est aussi souhaitable pour éviter les faibles mouvements liés à la respiration mais nous ne disposons pas de ce type fixation compatible avec la machine microTEP-CT disponible.

4.2. Effet mécanique de l'aiguille sur la neuroinflammation

Comme le geste chirurgical entraîne une inflammation, notre objectif était de chercher une aiguille la plus fine possible pour limiter la destruction mécanique du tissu. Bien que l'aiguille II soit plus fine, les résultats d'induction du modèle ne se sont pas avérés reproductibles : certaines souris ne présentaient pas de mort neuronale au niveau CA1 à 7 jours après injection d'AK. Comme démontré par une injection de ^{18}F -FDG dans les gels d'agarose (**Figure II-3-4**), l'injection par l'aiguille II ne déposait pas le volume injecté de façon reproductible.

Cette aiguille est possiblement trop souple et trop fine de sorte que la pression du tissu (simulée par le gel d'agarose) empêche un dépôt précis de 50nl. Nous avons donc utilisé l'aiguille I pour l'ensemble de l'expérimentation malgré son diamètre plus élevé.

La TEP et l'autoradiographie ont aussi montré l'effet mécanique très limité de l'aiguille I par rapport à l'effet de l'AK (**Figures II-3-7 et II-3-8**). Ces images ont montré la capacité de la TEP à détecter des signaux inflammatoires au niveau de l'hippocampe ayant reçu l'injection d'AK bien que sa taille soit minuscule (environ 2,5 mm dans le grand axe au niveau de l'hippocampe dorsal).

5. Conclusion

Ce chapitre a décrit l'optimisation et le choix du protocole expérimental mis en œuvre pour l'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714 dans un modèle d'épilepsie chez la souris. Ce travail préliminaire a montré la faisabilité de la TEP pour détecter des signaux inflammatoires à 7 jours après injection d'AK dans le modèle considéré.

C'est sur cette base que nous avons ensuite réalisé une étude longitudinale pour comprendre le rôle de neuroinflammation dans la constitution de la sclérose hippocampique. Le prochain chapitre va présenter cette étude longitudinale, qui avait pour but d'étudier la relation entre neuroinflammation et l'évolution de la sclérose hippocampique au cours de sa constitution.

Chapitre III. Apport de l'imagerie de la TSPO dans le suivi de la sclérose hippocampique chez un modèle d'épilepsie mésiotemporale chez la souris

1. Introduction et objectifs

La sclérose de l'hippocampe est présente dans une des formes d'épilepsie la plus fréquente et la plus pharmacorésistante chez l'homme (Blumcke *et al.* 2013). La résection chirurgicale est efficace, permettant d'obtenir environ 80% de guérisons avec suppression complète des crises (von Lehe *et al.* 2006).

Comme expliqué précédemment, le modèle d'épilepsie induit par injection intrahippocampique d'AK chez la souris est un modèle bien reproductible présentant des aspects histologiques et cliniques proches de ceux rencontrés dans l'épilepsie du lobe temporal chez l'homme.

De récents travaux ont révélé l'existence de processus inflammatoires au niveau de la sclérose hippocampique chez des patients épileptiques ainsi que dans des modèles rongeurs. La protéine translocatrice de 18kDa (TSPO) est, à l'heure actuelle, considérée comme un marqueur de la neuroinflammation qui peut être imagée *in vivo* par la TEP à l'aide du ^{18}F -DPA-714.

Nos objectifs sont :

- de déterminer si la TEP ^{18}F -DPA-714 peut suivre *in vivo* la neuroinflammation impliquée dans différentes phases de la constitution de la sclérose hippocampique.
- de comparer le signal TEP au signal observé sur l'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714
- de corréler l'évolution du signal TSPO aux différents types des cellules gliales par immunohistofluorescence.

2. Matériels et méthodes

2.1. Modèle d'animal

Le modèle est celui décrit dans la **partie 2.2** du **chapitre 2** concernant le protocole d'injection intrahippocampique d'AK chez la souris.

2.2. Protocole d'étude longitudinale

Le planning d'imagerie longitudinale est résumé sur la figure suivante (**figure III-2-1**), qui inclut les séances d'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714, l'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 et l'immunofluorescence.

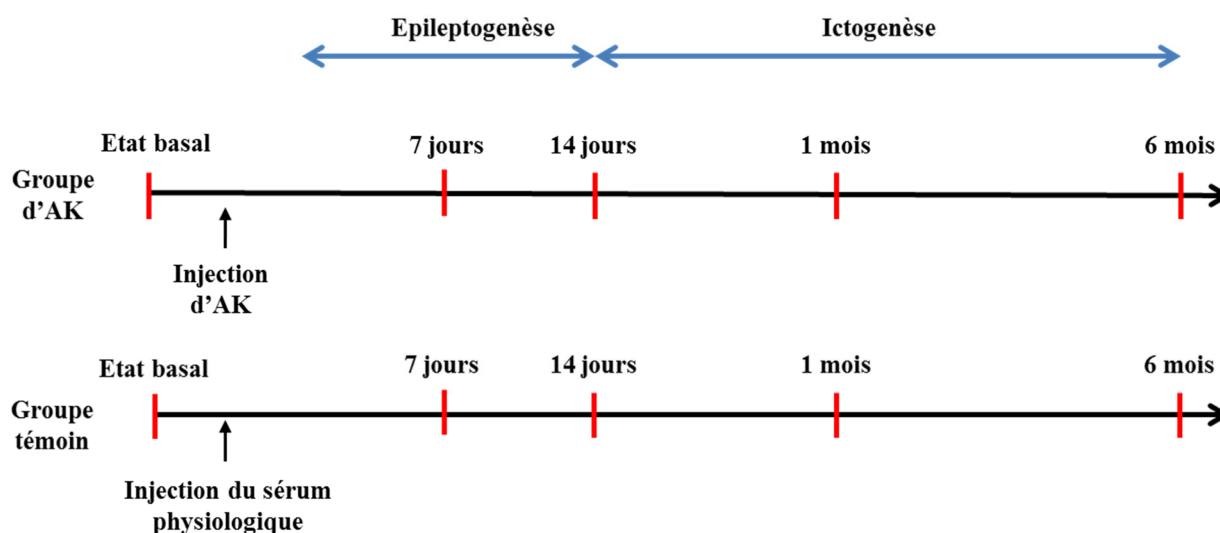


Figure III-2-1. Planning d'imagerie longitudinale.

La TEP a été réalisée chez des souris à l'état basal (qui recevront par la suite une injection d'AK dans le groupe AK (n= 9) ou de liquide physiologique dans le groupe témoin (n=8)), puis à 7 jours (n=6 et n=5 respectivement), à 14 jours (n=6 et n=4 respectivement), à 1 mois (n=8 et n=8 respectivement) et à 6 mois (n=8 et n=6 respectivement).

Des scans ont été répétés chez le même animal autant que possible. Tous les animaux n'ont pas pu être imagés à tous les temps parce que le nombre d'examen par jour était limité en raison de

la décroissance de la RAS (comme expliqué dans la discussion de la **partie 4.1 du chapitre 2** sur l'acquisition dynamique de 60 minutes) ou parce que la pose du cathéter a échoué en raison de la fragilité de la veine après plusieurs examens consécutifs.

Des souris AK supplémentaires à 1 jour (n=4) et à 3 jours (n=4) ont été ajoutées afin d'analyser la neuroinflammation dans la période de l'état de mal et à un temps précoce de l'épileptogénèse respectivement.

Trois souris supplémentaires ont été euthanasiées à l'état basal et aux différents moments correspondant à l'imagerie TEP des souris AK et des souris témoins afin de réaliser l'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 et l'immunofluorescence.

2.3. Acquisition dynamique TEP-CT au ^{18}F -DPA-714 et traitement d'images

Les acquisitions ont été réalisées et les données analysées comme décrit dans la **partie 2.1 du chapitre 2** sur le protocole d'acquisition d'imagerie au ^{18}F -DPA-714.

L'étude de déplacement par injection de 1mg/kg de DPA-714 froid à 60 minutes après injection de ^{18}F -DPA-714, en vue de déterminer la spécificité de fixation du marqueur, a été réalisée à 3 jours après injection d'AK (n=3). A ce stade le signal TEP était élevé et diffus dans l'ensemble du cerveau.

2.4. Autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714

Les autoradiographies ont été réalisées comme décrit dans la partie 2.2 du chapitre 2 concernant l'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714.

Pour localiser le signal ^{18}F -DPA-714 et dessiner des régions d'intérêt (ROI), les coupes ayant servi à l'autoradiographie ont été colorées à l'Hématoxyline et à l'Eosine (H&E). Ensuite, elles ont été imagées à l'aide d'un scanner ImageScanner (GE) et recalées aux images d'autoradiographie correspondantes en utilisant Pmod 3.6. (**Figure III-2-2**).

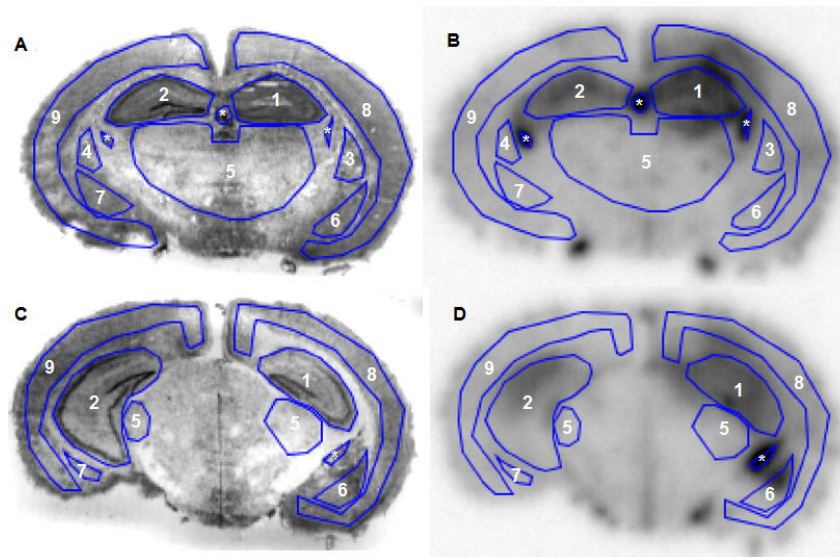


Figure III-2-2. Coupes colorées au H&E au niveau de l'hippocampe dorsal (A) et ventral (C) utilisées pour localiser et dessiner manuellement des ROI, qui ont ensuite été appliquées sur des images d'autoradiographie (B, D). Hippocampes droit (1) et gauche (2), striatum droit (3) et gauche (4), thalamus (5), amygdales droit (6) et gauche (7), cortex droit (8) et gauche (9) et ventricules (*).

Pour une analyse semi-quantitative, nous avons analysé 6 coupes par souris. Pour chaque coupe, les ROI ont été manuellement dessinées dans l'hippocampe droit et gauche, les striatum droit et gauche, le thalamus, les amygdales droite et gauche, le cortex droit et gauche (**Figure III-2-2**) permettant de mesurer une intensité moyenne du signal pour chaque région. Pour chacune de ces régions, l'intensité moyenne du signal a été normalisée à celle de la coupe entière. L'analyse a été faite à l'aide du logiciel ImageJ. Les avantages et les limites à l'utilisation de la coupe entière du cerveau comme la zone de référence seront discutés dans la partie discussion de ce chapitre.

Etude de blocage par DPA-714 froid, en vue de déterminer la spécificité de fixation du marqueur. L'étude a été réalisée en utilisant le même protocole d'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 avec ajout de 4 μmol de DPA-714 froid à la solution du radioligand.

2.5. Immunohistofluorescence (IHF)

L'expérimentation a été réalisée sur des coupes adjacentes à celles utilisées pour l'étude en autoradiographie.

Etape de préparation. Des coupes congelées ont été fixées avec le PFA 10% pendant 15 minutes, puis lavées dans du PBS pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été plongées dans la solution NH_4Cl pendant 5 minutes pour neutraliser des molécules de PFA libres qui n'ont pas servi à la fixation de l'échantillon, puis lavées dans du PBS pendant 5 minutes. La perméabilisation des cellules a été ensuite réalisée en plongeant les coupes dans une solution de méthanol/acétone pendant 5 minutes, suivie d'une solution de triton-X100 à 1% pendant 5 minutes, avant d'être de nouveau lavées dans du PBS pendant 5 minutes. Cette étape de préparation s'est terminée par une saturation des sites non-spécifiques en incubant des coupes dans une solution d'albumine bovine (BSA 10%) et 0,5% de Tween pendant 15 minutes. Cette étape de préparation est résumée sur la **figure III-2-3**.

Triple marquage de microglie (CD11b), astrocyte (GFAP) et TSPO. Les coupes préparées ont été incubées pendant 1 heure avec l'anticorps primaire, puis lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS, avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire pendant 30 minutes. L'incubation a été réalisée à température ambiante. Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS, des lames ont été montées en utilisant un milieu de montage contenant du DAPI, un marqueur du noyau qui émet une fluorescence dans le bleu après stimulation laser.

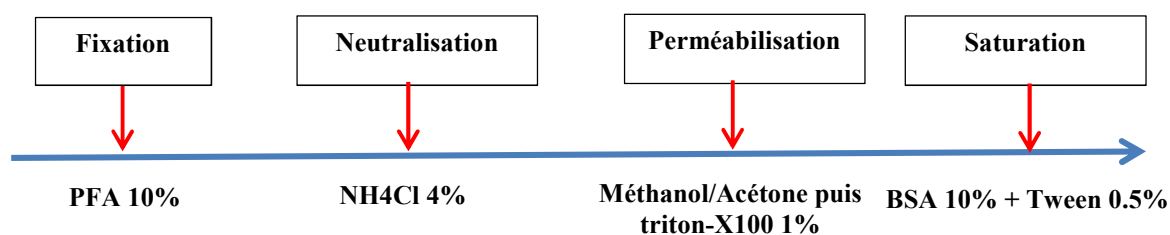


Figure III-2-3. Schéma de l'étape de préparation pour immunofluorescence.

La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés est donnée dans le tableau suivant.

Tableau III-2-1. Liste des anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques

Antigène	Source animale de l'anticorps	Dilution	Fournisseur
Anticorps primaires			
TSPO	Lapin	1/500	Abcam
CD11b	Rat	1/200	Abcam
GFAP	Poulet	1/500	Abcam
CD31	Rat	1/500	
Anticorps secondaires			
Anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa-488	Âne	1/1000	Molecular Probes
Anti-IgG de rat couplé à l'Alexa-546	Âne	1/1000	Molecular Probes
Anti-IgG de poulet couplé à l'Alexa-647	Chèvre	1/1000	Molecular Probes

Double marquage de TSPO et des cellules endothéliales (CD31). L'expérimentation a été réalisée avec le même protocole d'immunofluorescence que celui décrit ci-dessus.

Acquisition des images. Une acquisition en mode mosaïque permettant de visualiser toute la coupe avec un grossissement de 20X a été réalisée à l'aide d'une caméra connectée au microscope AxioObserver Z1 (Zeiss). L'acquisition s'est faite en mode séquentiel pour éviter la contamination de fluorescence entre les canaux de différentes longueurs d'onde. Les temps d'exposition pour chaque canal ont été réglés de telle sorte que la luminosité des pixels n'a jamais été saturée. Ces paramètres ont été maintenus pendant toute l'acquisition et pour toutes les expérimentations. La fusion des images mosaïques a été réalisée par le logiciel AxioVision 4.6 (Zeiss).

Analyse de la distribution des cellules gliales au niveau des hippocampes. L'image des noyaux DAPI a été utilisée pour déterminer les régions hippocampiques. Pour visualiser les microglies et les astrocytes de manière reproductible entre différentes expérimentations, un seuillage automatique (Moment Dark) a été appliqué à toutes les images (Notter *et al.* 2017). Le traitement a été fait en utilisant ImageJ.

Analyse de colocalisation. Une colocalisation du marquage correspond à une superposition des marquages vert et rouge visualisée sur l'image par du jaune ou à une superposition du vert et magenta visualisée sur l'image par du blanc.

Analyses statistiques. Toutes les données quantitatives (TEP et autoradiographie) ont été analysées en utilisant des tests non-paramétriques et les résultats sont présentés au moyen de la médiane (25% percentile – 75% percentile). Pour les données TEP, nous avons utilisé le test de Wilcoxon apparié pour comparer des résultats entre chaque temps avec ceux de l'état basal de la même souris. Pour les données d'autoradiographie, le test Mann-Whitney a été utilisé pour

comparer des résultats entre chaque temps avec ceux de l'état basal. Des analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel Prism 6 (GraphPad). La valeur de $p < 0,05$ a été interprétée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1. Evolution des signaux ^{18}F -DPA-714 dans l'étude TEP longitudinale

A l'état basal, la fixation cérébrale du ^{18}F -DPA-714 varie de 1,34 %ID/cc [1,32-1,40] dans le cortex à 1,85 %ID/cc [1,71-1,87] dans le cervelet. Chez les animaux du groupe témoin (qui recevront par la suite une injection de liquide physiologique au niveau de l'hippocampe droit), la fixation est 1,51 %ID/cc [1,41-1,58] et 1,42 %ID/cc [1,34-1,47] dans les hippocampes droit et gauche respectivement. Chez les animaux du groupe d'AK qui recevront par la suite l'AK, cette fixation hippocampique est 1,45 %ID/cc [1,38-1,54] à droite et 1,39 %ID/cc [1,29-1,45]. Aucune différence significative n'est observée entre l'hippocampe droit et gauche, ni dans le groupe AK, ni dans le groupe témoin à l'état basal (**Figure III-3-1**).

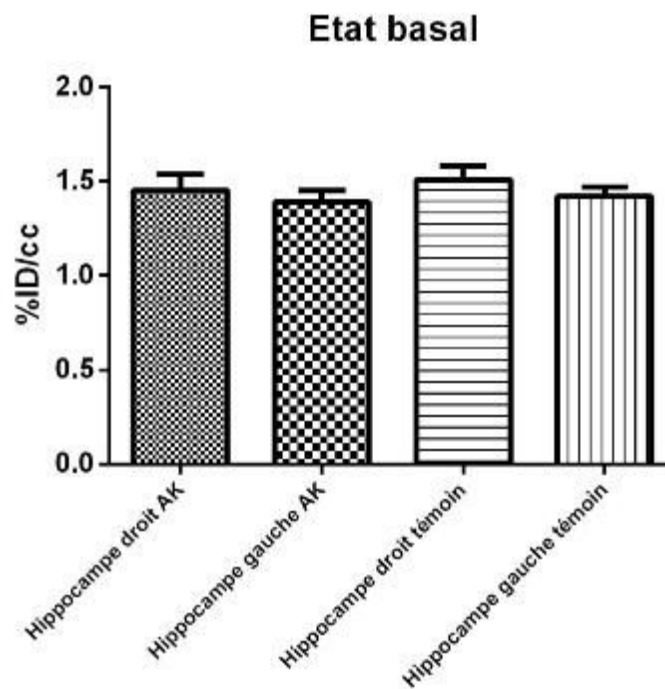
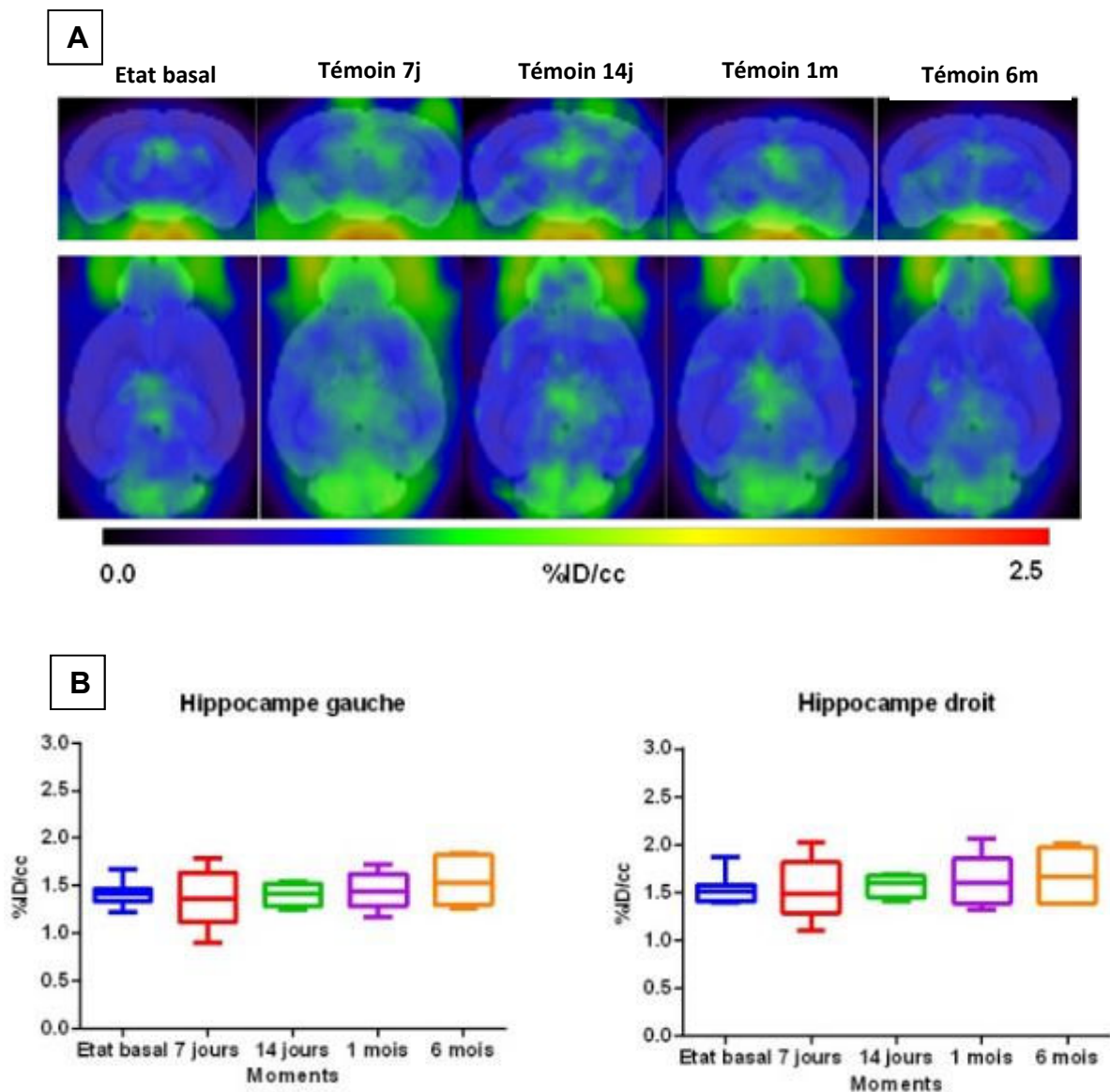


Figure III-3-1. Fixation hippocampique (%ID/cc) à l'état basal.

Après la réalisation des injections intra-hippocampiques de solution saline ou d'AK, les animaux sont suivis par TEP à 7, 14 et 30 jours puis à 6 mois. Deux temps supplémentaires réalisés à 1 jour et à 3 jours ont été ajoutés, uniquement pour le groupe AK afin de visualiser l'inflammation au sein de l'état de mal et au moment où commence la période silencieuse (épileptogénèse).

Chez les souris témoins, à tous les moments et dans toutes les régions, aucune différence significative des signaux TEP n'est retrouvée comparativement à l'état basal. Même 7 jours après la chirurgie, la fixation de l'hippocampe injecté est de 1,48 %ID/cc [1,29-1,82] ce qui n'est pas significativement différent par rapport à l'état basal. Il n'y a pas non plus de différence significative de fixation dans les hippocampes à 6 mois (1,67% [1,38-1,96]) après la chirurgie par rapport à celle de l'état basal (**Figure III-3-2**).



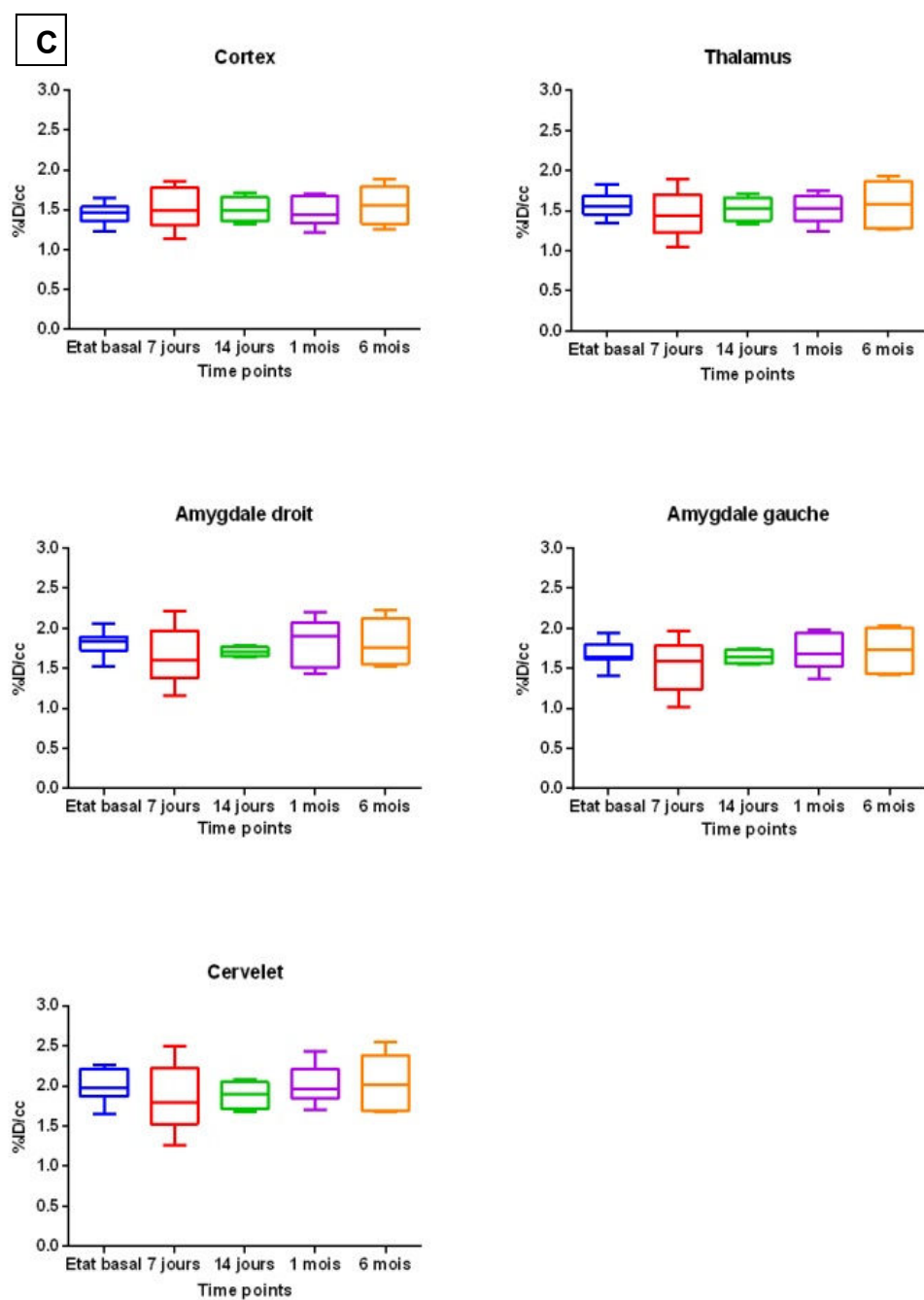


Figure III-3-2. Images cérébrales des plans coronal (images du haut) et transaxial (images du bas) de fixation de ^{18}F -DPA-714 chez la même souris témoin aux différents moments (A) et son évolution (%ID/cc) au cours du temps dans les hippocampes (B) et dans d'autres régions du cerveau (C).

Chez les souris AK, dans les hippocampes, par rapport à l'état basal, le signal est fortement augmenté et atteignait un pic à 3 jours après injection, prédominant du côté injecté. Du côté controlatéral à l'injection, le signal diminue ensuite progressivement pour revenir à l'état basal à 1 mois après injection d'AK. Du côté de l'injection, le signal observé diminue également progressivement, se maintenant cependant stable entre 7 jours et 1 mois avant de décroître au-delà sans jamais retourner à l'état basal puisqu'il persiste encore 6 mois après induction du modèle (Figure III-3-3A, 3B).

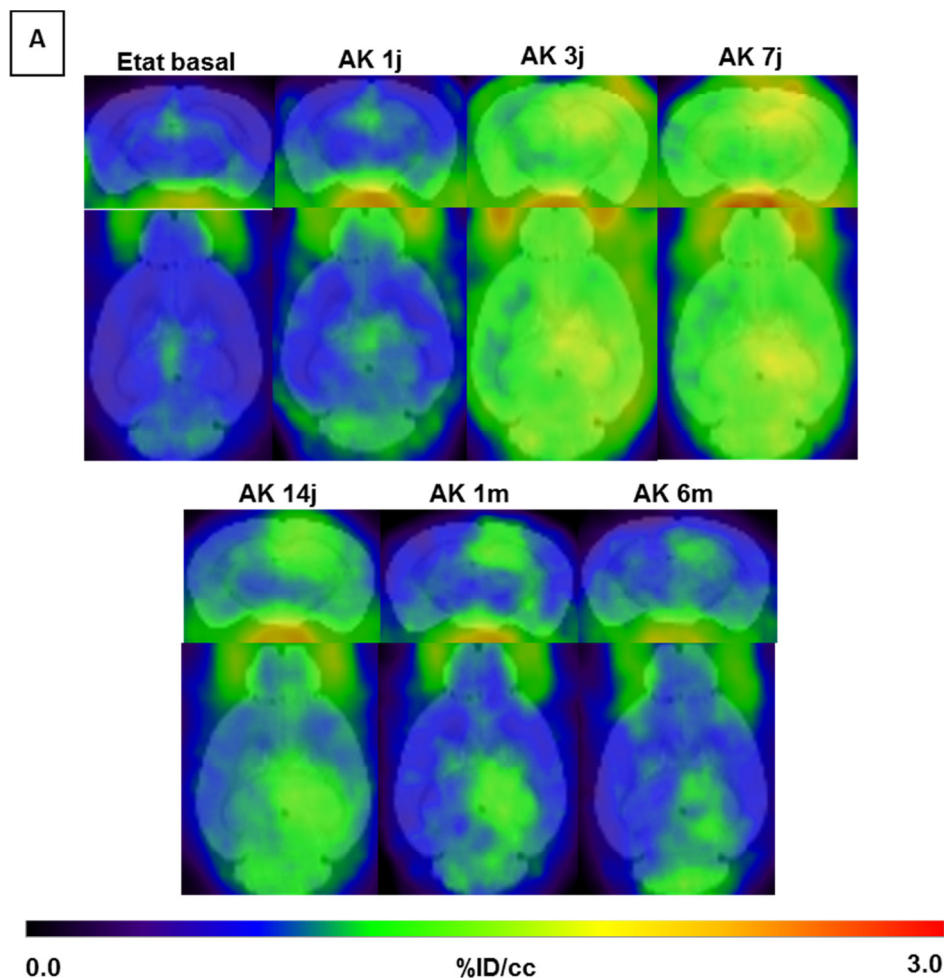


Figure III-3-3A. Images cérébrales des plans coronal et transaxial de fixation de ^{18}F -DPA-714 chez la même souris témoin aux différents moments : état basal, 1 jour (état de mal), 3 jours (fin d'état de mal et début de la période silencieuse), 7 jours (au milieu de l'épileptogénèse), 14 jours, 1 mois, 6 mois (ictogénèse).

B

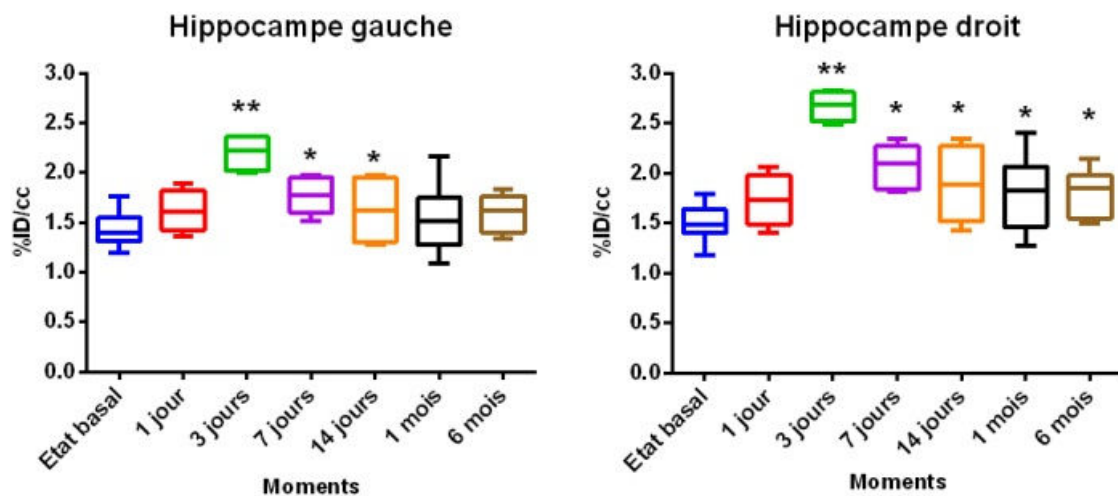
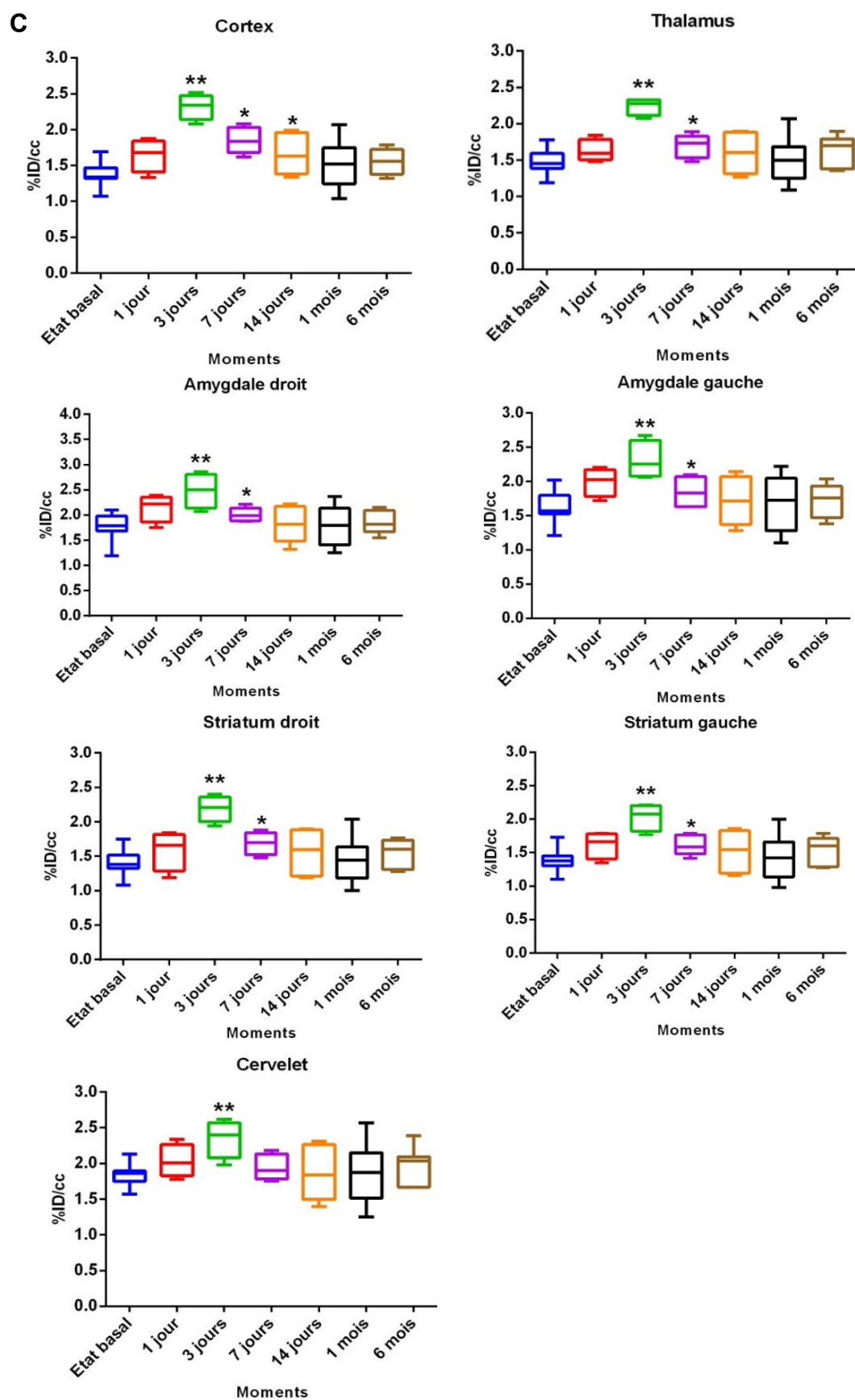


Figure III-3-3B. Evolution de la fixation de ^{18}F -DPA-714 (%ID/cc) au sein des hippocampes.

* correspond à la différence significative entre chaque moment après injection d'AK et à l'état basal et ** correspond à la fois la différence significative à l'état basal et à d'autre moments après injection d'AK (test de Wilcoxon).

Chez les souris AK, dans les zones extrahippocampiques, 3 jours après injection, la fixation est massive dans l'ensemble du cerveau (striatum, cortex, thalamus, amygdales et même cervelet). Ces signaux par la suite diminuent au cours du temps et reviennent à un niveau basal à un moment différent en fonction de la région : le cervelet à 7 jours, le striatum, le thalamus et les amygdales à 14 jours et le cortex à 1 mois.

Figure III-3-3C (en dessous). Evolution de la fixation de ^{18}F -DPA-714 (%ID/cc) dans les zones extrahippocampiques. * correspond à la différence significative entre chaque moment après injection d'AK et à l'état basal et ** correspond à la fois la différence significative à l'état basal et à d'autre moments après injection d'AK (test de Wilcoxon).



La **figure III-3-4** montre un déplacement du signal ^{18}F -DPA-714 dans différentes régions (hippocampes, cortex, cervelet) par injection de DPA-714 froid à 60 minutes après le scan chez une souris épileptique à 3 jours démontrant la spécificité du signal dans l'ensemble du cerveau à 3 jours après injection d'AK.

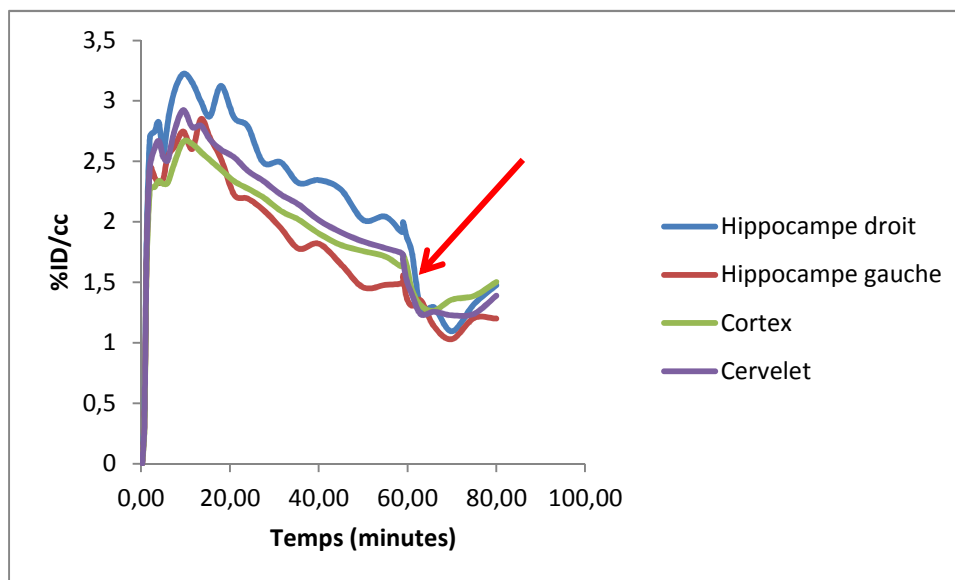


Figure III-3-4. Déplacement du signal ^{18}F -DPA-714 par injection de DPA-714 froid à 60 minutes.

3.2. Caractérisation par autoradiographie in vitro au ^{18}F -DPA-714

3.2.1. Analyse visuelle

L'autoradiographie permet de visualiser avec une résolution spatiale plus élevée la distribution d'un traceur à l'échelle des structures cérébrales en s'affranchissant de la biodistribution et du métabolisme de ce traceur.

Dans le cerveau des souris à l'état basal, nous observons un signal intense et localisé uniquement au niveau des ventricules latéraux et du 3^{ème} ventricule. Dans le cerveau des souris témoins, outre le signal ventriculaire, nous observons un hypersignal localisé le long du trajet de

l'aiguille à 7 et 14 jours après injection qui n'est plus présent à partir d'un mois et au-delà (**Figure III-3-5**).

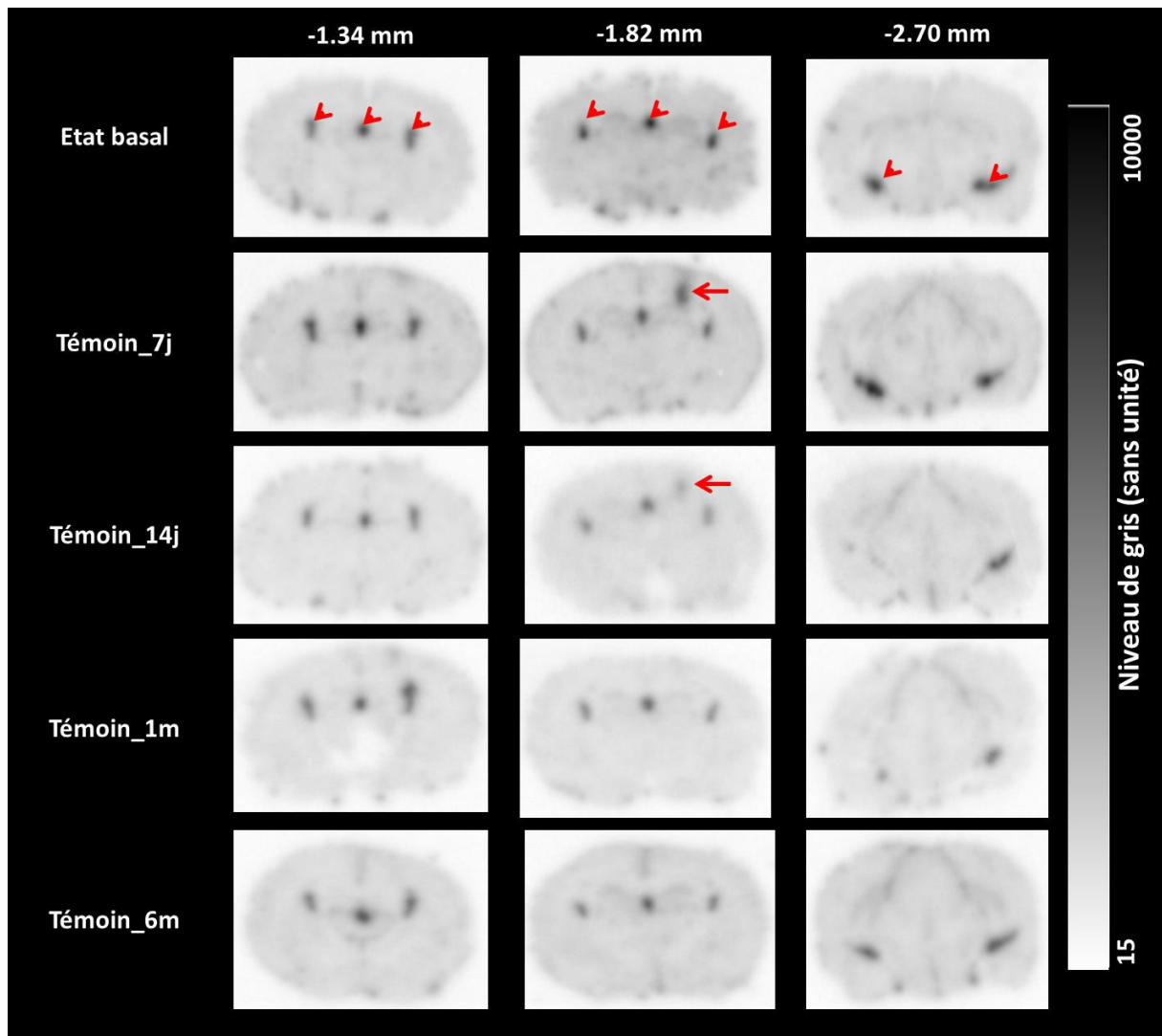


Figure III-3-5. Autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 sur des coupes du cerveau des souris à l'état basal et des souris témoins aux différents moments après injection. Les images ont été représentées aux différents niveaux par rapport au bregma (-1,34mm ; -1,82mm ; -2,7 mm). Les pointes de flèches rouges correspondent aux signaux intenses et localisés au niveau des ventricules bilatéraux et du 3^{ème} ventricule. Les flèches rouges correspondent au trajet d'aiguille à 7 et 14 jours après injection de sérum physiologique.

Chez les souris AK, en dehors des signaux ventriculaires, un signal localisé et élevé est visible dans l'hippocampe droit à partir de 7 jours jusqu'à 6 mois, plus intense à 1 mois après induction du modèle. Le signal dans l'hippocampe gauche est également plus élevé entre 7 jours et 1 mois mais d'une amplitude relative plus faible en comparaison à l'hippocampe droit (**Figure III-3-6**).

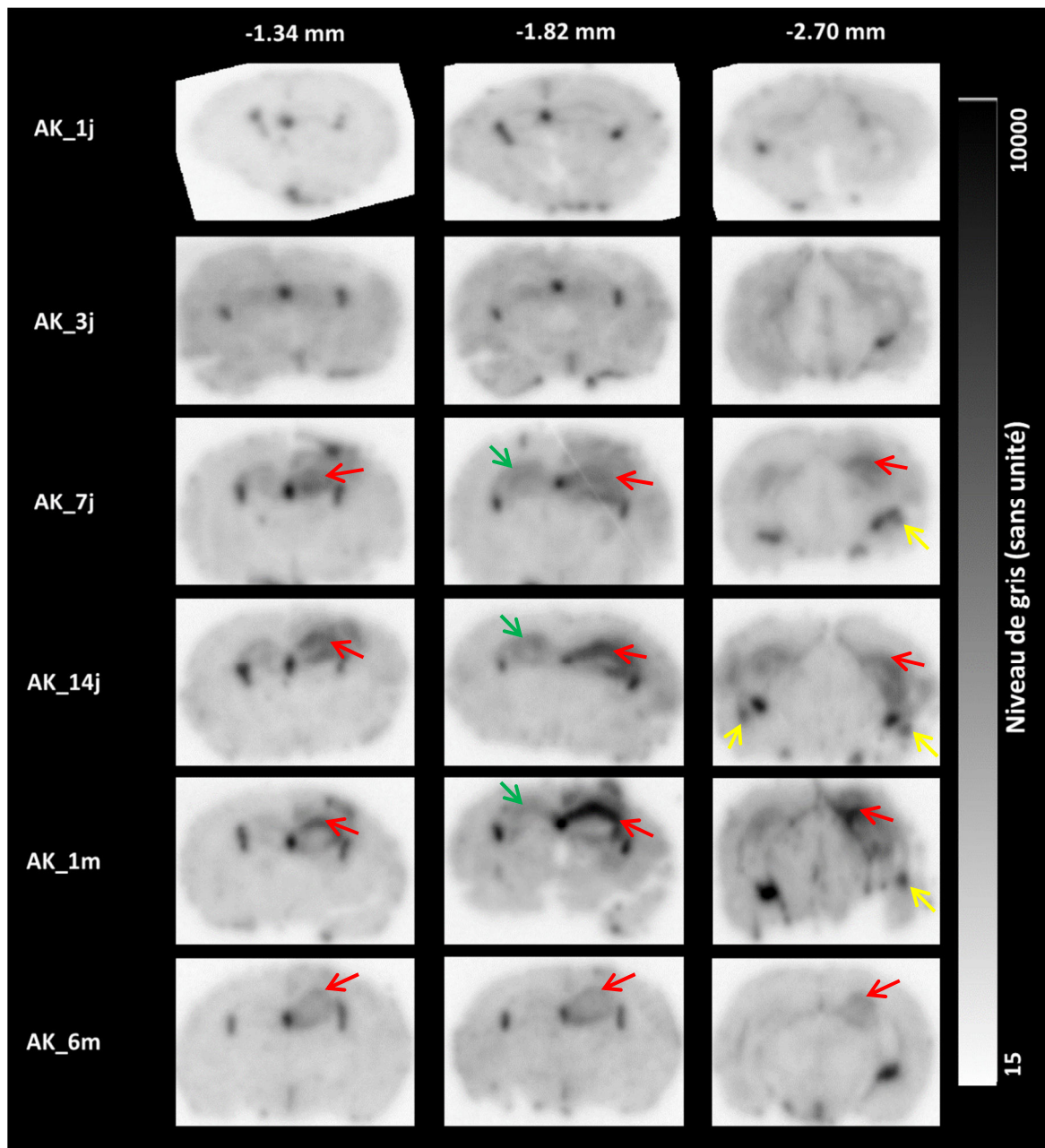


Figure III-3-6. Autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 sur des coupes du cerveau des souris AK aux différents moments après injection. Les images ont été représentées aux différents

niveaux par rapport au bregma (-1,34mm ; -1,82mm ; -2,7 mm). Les flèches rouges correspondent aux signaux élevés au niveau des hippocampes ipsilatéraux et les flèches vertes au niveau des hippocampes controlatéraux.

Concernant le signal élevé au sein de l'hippocampe droit entre 7 jours et 6 mois, nous observons qu'il prédominait au site de l'injection (-1,8mm) et mais s'étend au moins 0,5mm en avant (ensemble de l'hippocampe dorsal) et 1mm en arrière (une partie de l'hippocampe ventral).

En dehors des hippocampes (**figure III-3-6**), entre 7 jours et 1 mois, nous observons également des foyers d'hyperfixation au niveau du cortex droit au-dessus de l'hippocampe droit, et au niveau du noyau de l'amygdale basolatérale (flèche jaune), proche du ventricule latéral.

Les tests réalisés par co-incubation du traceur radiomarqué avec un excès de ligand froid montrent une nette diminution du signal dans l'ensemble de la coupe du cerveau de souris AK 1 mois après induction du modèle illustrant ainsi la spécificité du marquage observé.

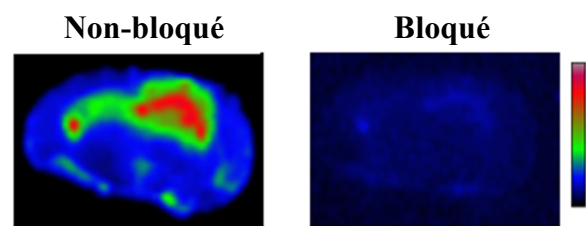


Figure III-3-7. Etude de blocage par DPA-714 froid

3.2.2. Analyse semi-quantitative

Par comparaison aux souris témoins, le signal dans l'hippocampe droit commence à augmenter 3 jours après injection d'AK pour parvenir à un plateau entre 7 jours et 1 mois. Son intensité diminuée à 6 mois est toujours plus élevée comparée à celle des souris témoins. Une hyperfixation est également observée dans l'hippocampe gauche de 7 jours à 1 mois mais revient au niveau des souris témoins à 6 mois (**Figure III-3-8A**).

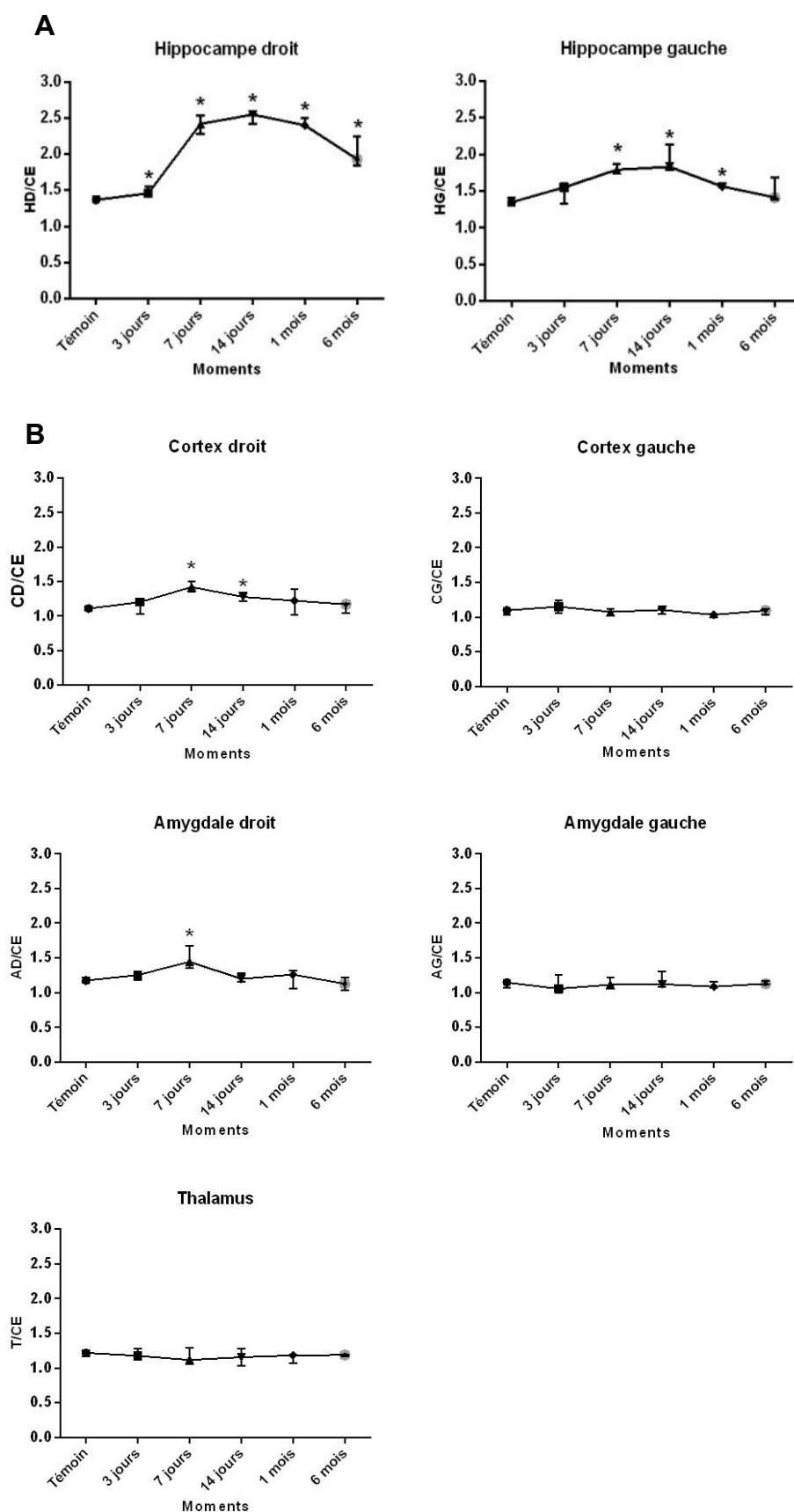


Figure III-3-8. Evolution du signal d'autoradiographie au ^{18}F -DPA-714 au cours du temps

dans les zones hippocampiques (A) et extrahippocampiques (B). Les petits astérisques (*) illustrent des différences significatives entre le temps considéré et le niveau témoin de cette même région (test Mann-Whitney). Hippocampe droit (HD), hippocampe gauche (HG), cortex droit (CD), cortex gauche (CG), amygdale droit (AD), amygdale gauche (AG), thalamus (T) et CE (cerveau entier).

En dehors des hippocampes, une hyperfixation est également observée dans le cortex droit entre 7 jours et 14 jours et revient au niveau des souris témoins à 1 mois. L'hyperfixation dans l'amygdale droite n'est observée qu'à 7 jours. Aucune différence significative n'est observée au niveau du cortex gauche, du thalamus et de l'amygdale gauche à n'importe quel moment (**Figure III-3-8B**).

3.3. Caractérisation de la sclérose hippocampique par immunohistofluorescence sur des images mosaïques

3.3.1. Evolution des cellules microgliales au cours du temps

A l'état basal, des microglies sont présentes dans des zones riches en fibres nerveuses (corps calleux, fimbria) et dans des zones périvasculaires. Au sein de l'hippocampe, le signal associé aux microglies est faible et difficile à observer (**Figure III-3-9A**).

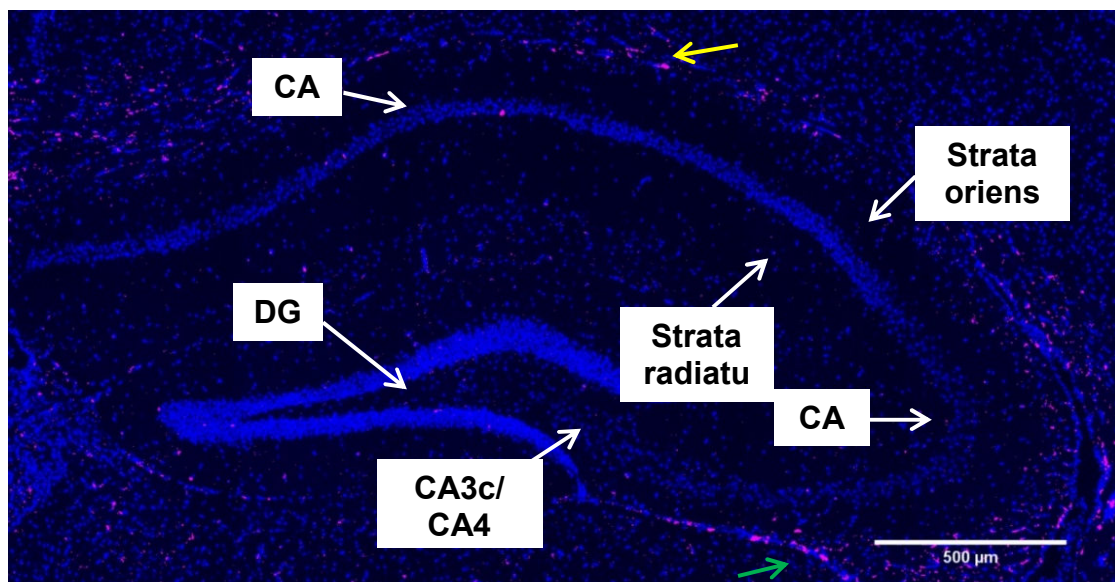


Figure III-3-9A. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à l'état basal. CD11b (magenta), DAPI (bleu). Zone du corps calleux (flèche jaune) et zone périvasculaire (flèche verte). Cette figure de DAPI (bleu) montre aussi un hippocampe normal avec des couches pyramidales et ses projections (strata) et le gyrus dentelé (DG) (les flèches blanches).

A 1 jour après injection d'AK, l'activation microgliale est encore faible au sein de l'hippocampe. Nous n'observons que certaines microglies commencent à s'accumuler dans la zone de CA3a des hippocampes (**Figure III-3-9B**).

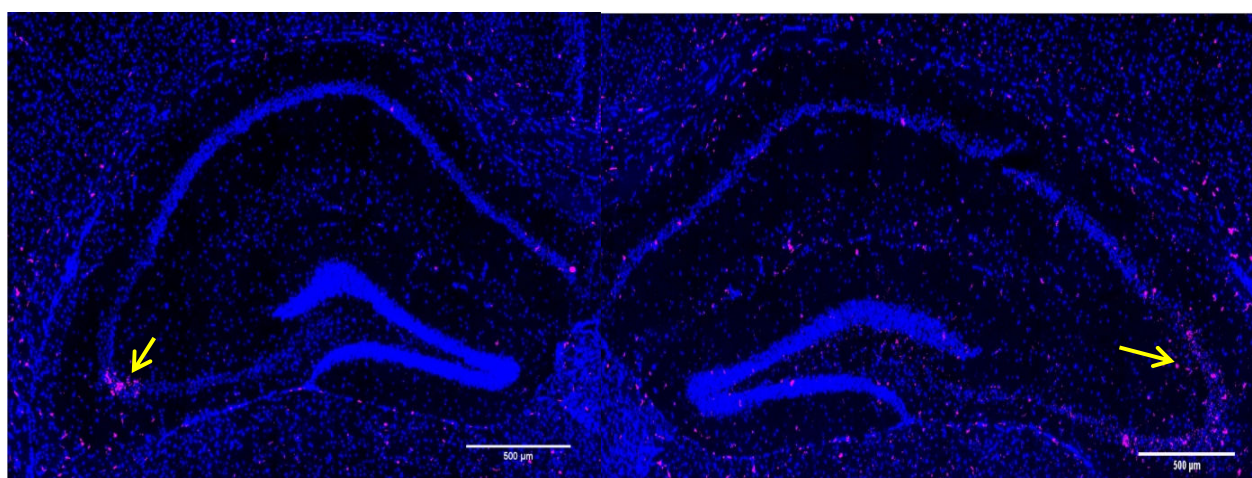


Figure III-3-8B. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à 1 jour après

injection d'AK. CD11b (magenta), DAPI (bleu). Microglies s'accumulant au niveau de CA3a bilatéral (flèches jaunes).

A 3 jours après injection d'AK, nous observons une activation microgliale bilatérale. A droite, des microglies activées prédominaient dans la couche pyramidale de CA3a, alors qu'à gauche, elles sont prédominantes dans les zones de projections axonales et dendritiques des cellules pyramidales (strata oriens et radiatum) (**Figure III-3-9C**).

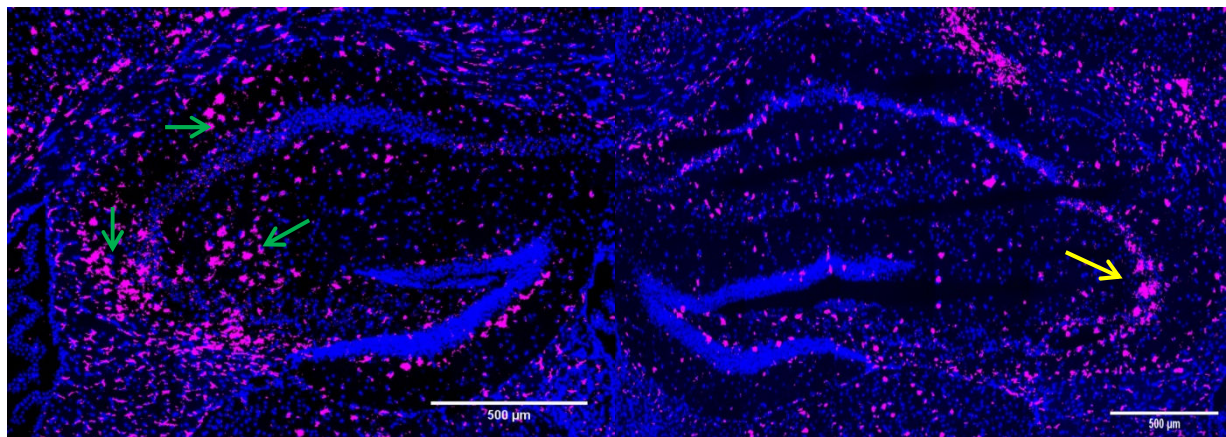


Figure III-3-9C. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à 3 jours après injection d'AK. CD11b (magenta), DAPI (bleu). A droite, microglies activées prédominantes au niveau de la couche pyramidale de CA3a bilatéral (flèche jaune). A gauche, elles prédominent au niveau des strata oriens et radiatum (flèches vertes).

A 7 jours après injection d'AK, nous observons une nette activation microgliale bilatérale importante et prédominante du côté injecté (**Figure III-3-9D**).

A droite, l'activation microgliale est observée essentiellement au sein de la couche des cellules pyramidales, de CA1 à CA3 bien que prédominante au niveau de l'aire CA3 (a-c) ainsi que sur leur zones de connexion au niveau des strata oriens, et lacunosum polymorphe, mais respectant la couche moléculaire des grains. D'autre part, une nette activation au sein des cellules du hile est aussi retrouvée.

A gauche, la distribution microgliale n'était présente que le long des projections axonales et dendritiques dans les strata oriens et radiatum des cellules pyramidales, respectant les couches cellulaires pyramidales et du hile.

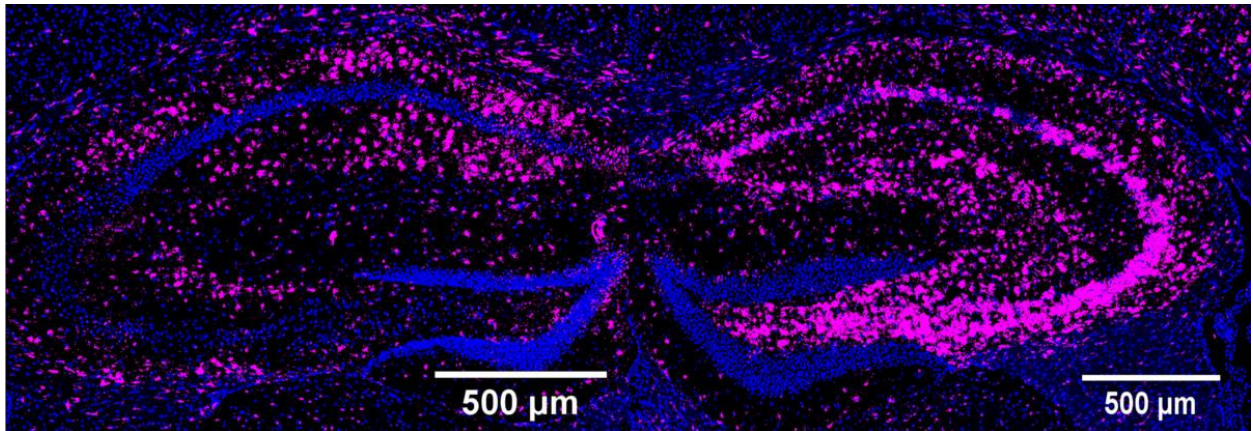


Figure III-3-9D. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à 7 jours après injection d'AK. CD11b (magenta), DAPI (bleu).

A 14 jours après injection d'AK, à droite, l'activation microgliale était diminuée particulièrement au niveau du hile et de la couche pyramidale CA3, avec aussi une nette perte de ces cellules (disparition des noyaux DAPI en bleu). L'activation microgliale persistait dans l'aire de CA1 et CA3c résiduelle (strata + couche pyramidale). Au niveau de l'hippocampe gauche, une nette diminution de l'activation microgliale dans les strata est également observée.

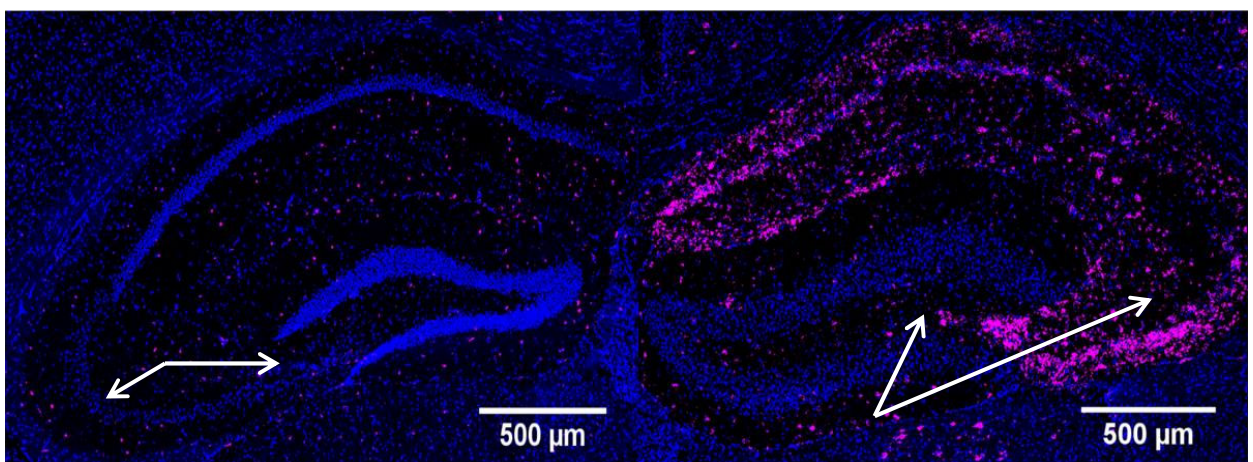


Figure III-3-9E. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à 14 jours

après injection d'AK. CD11b (magenta), DAPI (bleu). Perte des noyaux DAPI au niveau de CA3 à droite alors ils sont préservés à gauche (flèches blanches).

A 1 mois après injection d'AK, du côté droit, une nette diminution des microglies activées est notée mais persiste néanmoins dans la couche pyramidale résiduelle de CA1 et CA3 et dans ses strata correspondant. A gauche, nous n'observons plus l'activation microgliale.

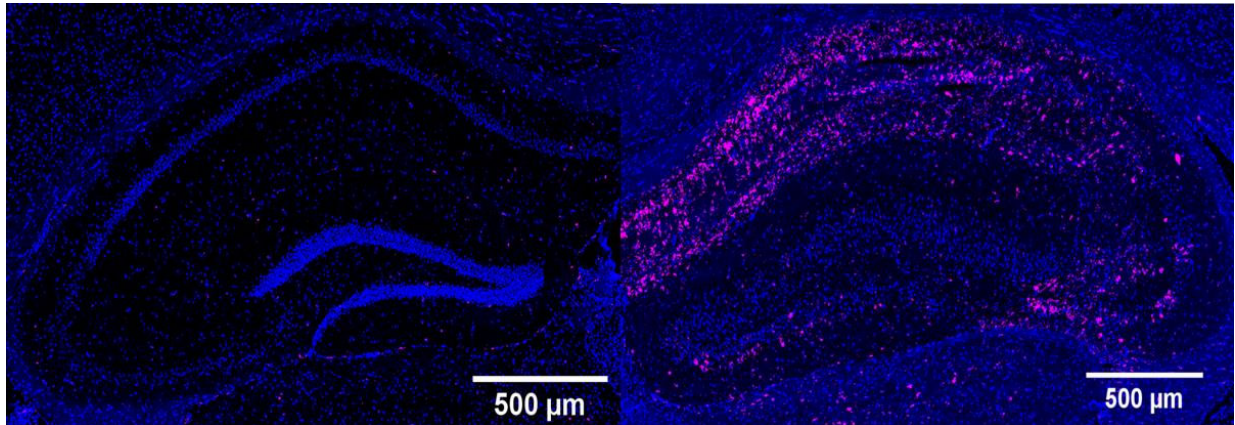


Figure III-3-9F. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à 1 mois après injection d'AK. CD11b (magenta), DAPI (bleu). Les noyaux DAPI sont quasiment disparus au niveau de la couche pyramidale à droite alors qu'ils sont préservés à gauche.

A 6 mois après injection d'AK, du côté droit, la densité de cellule CD11b activée est faible et principalement localisée dans la zone cicatricielle des aires CA1 et CA3. Dans ces mêmes zones, une perte complète des couches de cellules pyramidales est nettement observable. Une dilatation importante du ventricule droit est également observée. Du côté de l'hippocampe gauche, nous n'observons pas de microglie activée en densité supérieure à un animal contrôle.

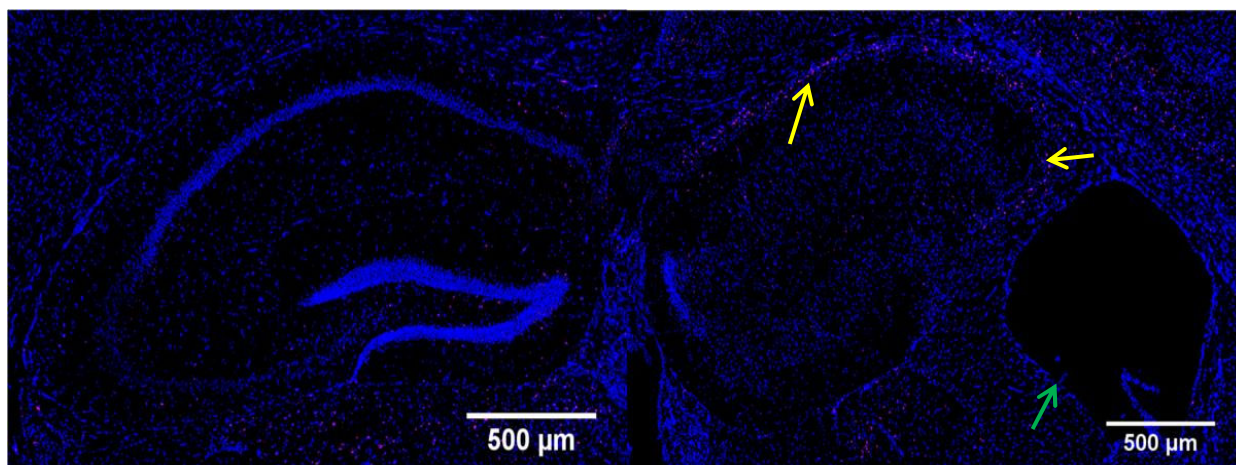


Figure III-3-9G. Distribution spatiale des microglies au sein des hippocampes à 6 mois après injection d'AK. CD11b (magenta), DAPI (bleu). Accumulation des cellules CD11b positives dans la zone cicatricielle des aires CA1 et CA3 (flèches jaunes). Disparition totale des noyaux DAPI au niveau de la couche pyramidale à droite, bien préservés à gauche. Dispersion importante du gyrus dentelé. Dilatation importante du ventricule droit (flèche verte).

3.3.2. Evolution des cellules astrocytaires au cours du temps

A l'état basal, les astrocytes sont présents de manière abondante et prédominante dans les strata et la couche moléculaire, mais ne sont pas présents dans les couches pyramidales et granulaires. Ils sont également abondants sur la paroi des ventricules et des vaisseaux. La distribution des astrocytes n'est pas dense, avec des espaces entre astrocytes.

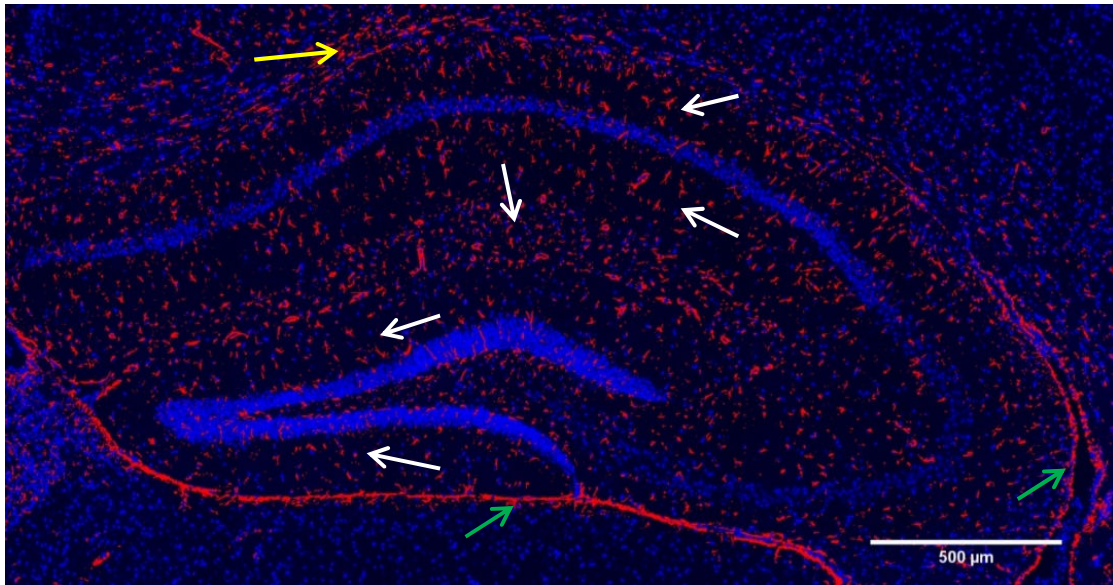


Figure III-3-10A. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à l'état basal. GFAP (rouge), DAPI (bleu). Zone du corps calleux (flèche jaune) ; paroi des ventricules et des vaisseaux (flèches vertes) ; strata oriens, radiatum et lucidum des cellules pyramidales et couche moléculaire des grains (flèches blanches).

A 1 jour après injection d'AK, nous commençons à observer une activation astrocytaire bilatérale avec une distribution plus dense du côté droit (flèche jaune).

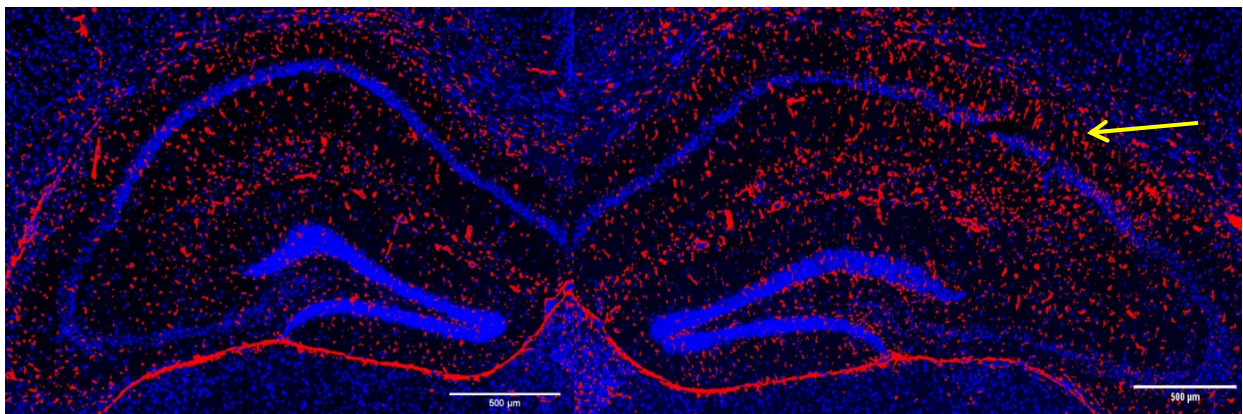


Figure III-3-10B. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à 1 jour après injection d'AK. GFAP (rouge), DAPI (bleu).

A 3 jours après injection d'AK, l'activation astrocytaire est importante de façon bilatérale avec une distribution plus dense du côté droit (flèche jaune). Cependant, comme à 1 jour, l'activation astrocytaire reste dans les strata oriens, radiatum et lucidum respectant les couches des cellules pyramidales et des grains, même du côté de l'injection.

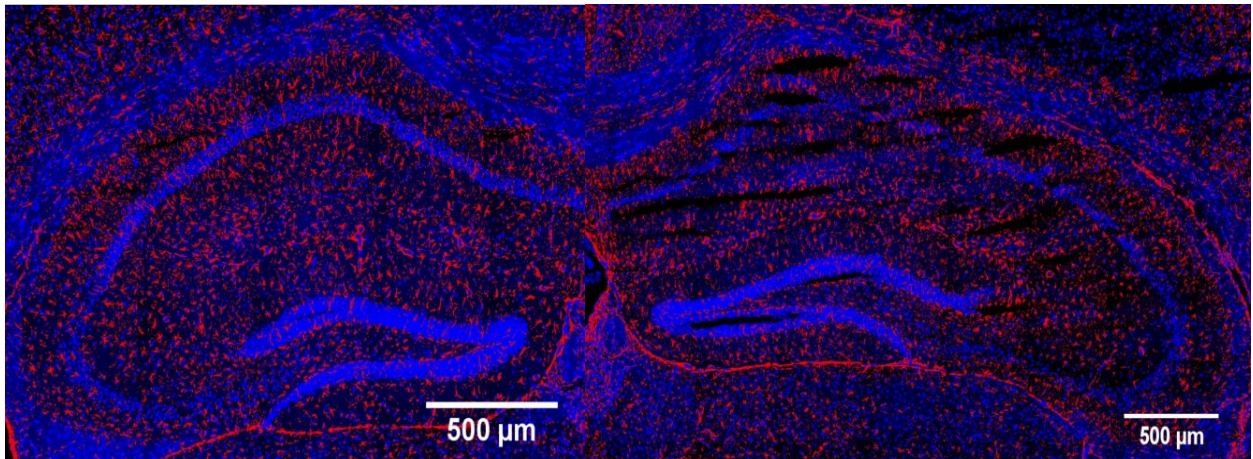


Figure III-3-10C. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à 3 jours après injection d'AK. GFAP (rouge), DAPI (bleu).

A 7 jours après injection d'AK, l'activation astrocytaire est bilatérale de manière homogène dans l'ensemble des hippocampes. La distribution était très dense avec peu d'espace entre des astrocytes (**Figure III-3-10D**).

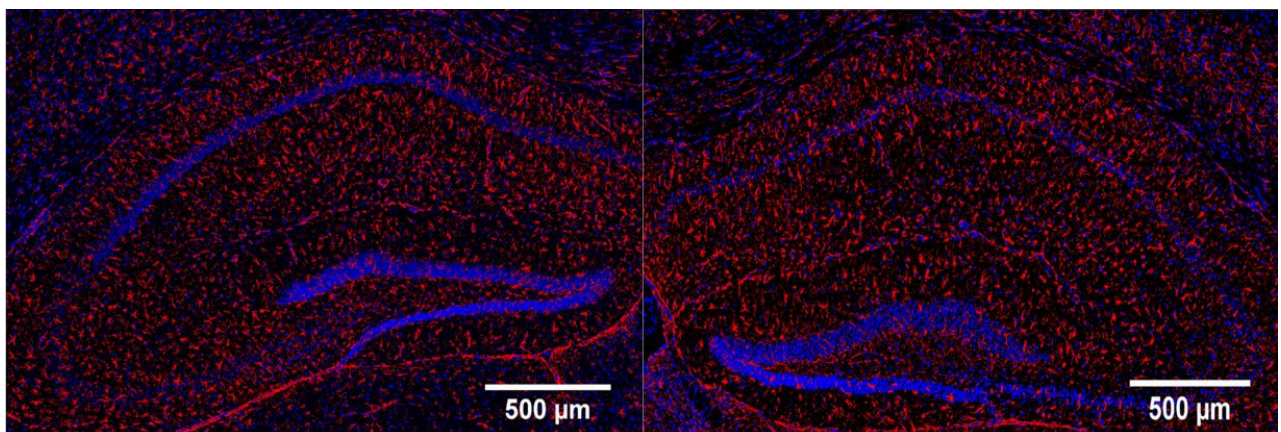


Figure III-3-10D. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à 7 jours après injection d'AK. GFAP (rouge), DAPI (bleu).

A 14 jours après l'injection d'AK, du côté de l'injection, l'activation astrocytaire persiste de façon intense, prédominante dans le hile et l'aire de CA3. Les cellules astrocytaires commencent à entrer au sein des couches granulaire (flèche jaune) et pyramidale (flèche verte). A gauche, la densité astrocytaire diminue mais n'est pas revenue à l'état basal (**Figure III-3-10E**).

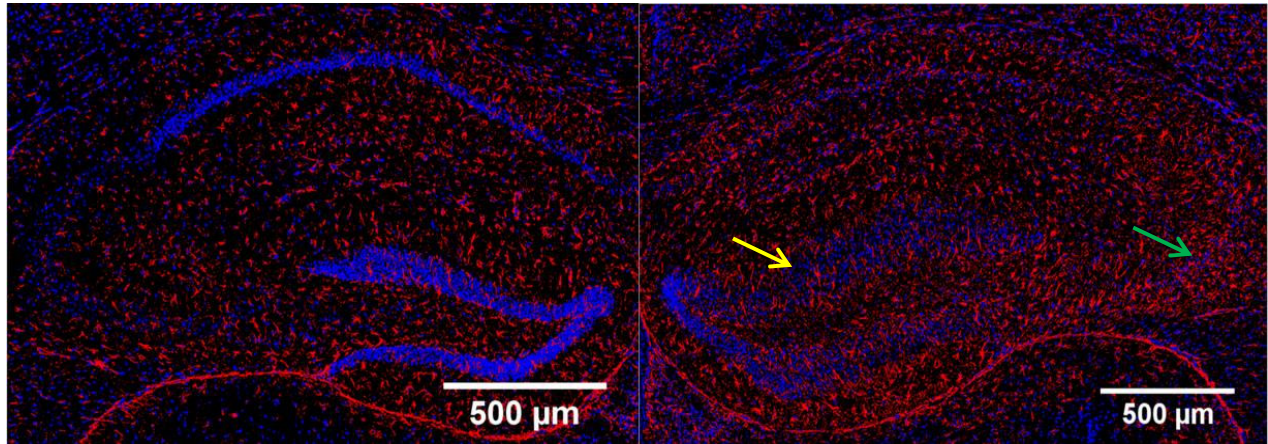


Figure III-3-10E. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à 14 jours après injection d'AK. GFAP (rouge), DAPI (bleu).

A 1 mois après l'injection d'AK, l'activation astrocytaire du côté droit s'accroît, prédominante dans les zones de mort neuronale comme en regard des couches des cellules pyramidales (flèches vertes) mais est aussi abondante dans la couche granulaire (flèche jaune). A gauche, la densité astrocytaire n'est toujours pas revenue à l'état basal (**Figure III-3-10F**).

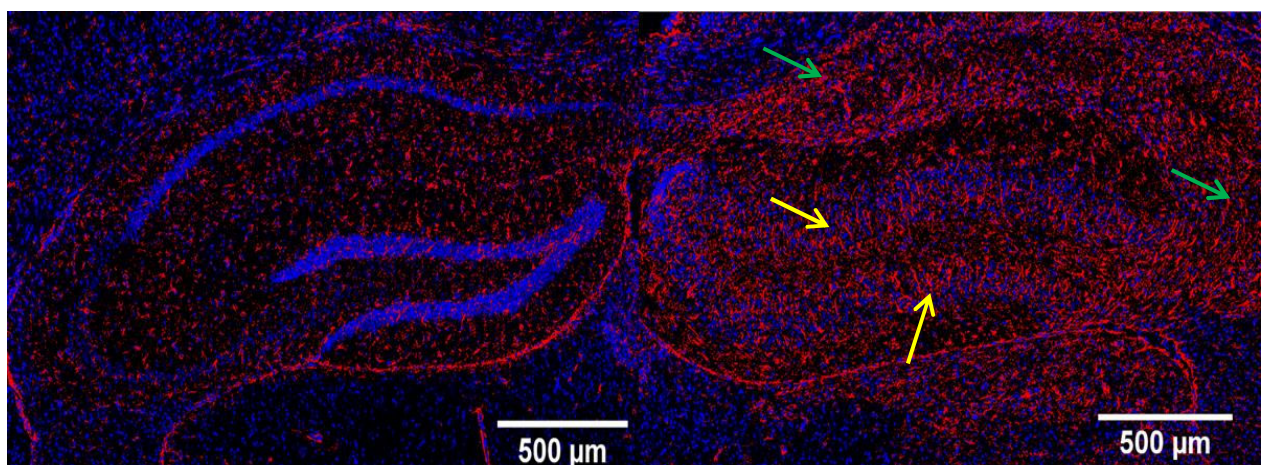


Figure III-3-10F. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à 1 mois après

injection d'AK. GFAP (rouge), DAPI (bleu).

A 6 mois après l'injection d'AK, à droite, la SH est constituée, avec une mort neuronale importante dans la couche pyramidale, remplacée par une astroglie importante constituant la cicatrice englobant la lésion (flèches vertes); des astrocytes étaient toujours présents de manière abondante dans la couche granulaire (flèche jaune). A gauche, la densité astrocytaire était toujours élevée par rapport à l'état basal (**Figure III-3-10G**).

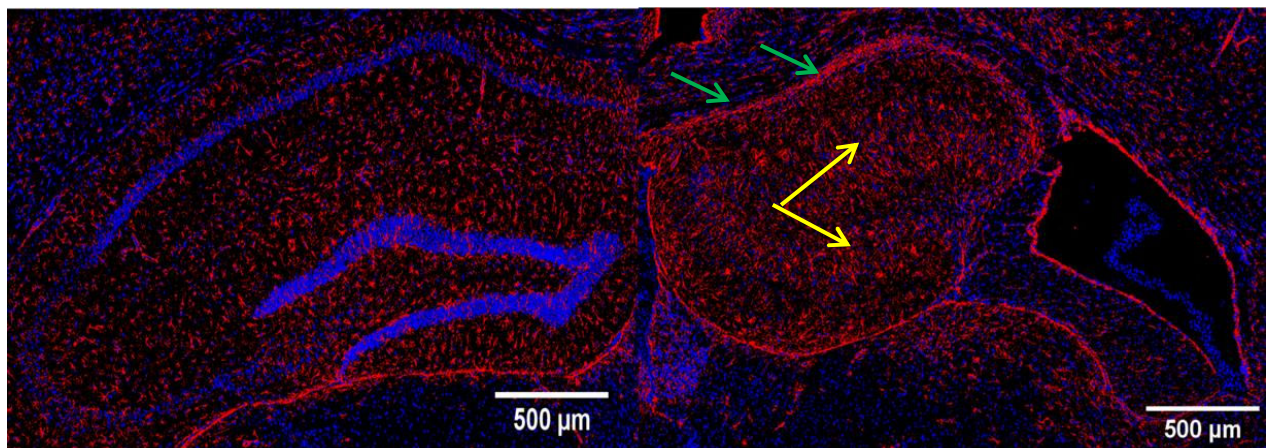


Figure III-3-10G. Distribution spatiale des astrocytes au sein des hippocampes à 6 mois après injection d'AK. GFAP (rouge), DAPI (bleu).

3.4. Analyse de colocalisation entre TSPO/microglie et TSPO/astrocyte sur des images à plus fort grossissement au niveau de CA1 et du hile des hippocampes

A l'état basal, des microglies (magenta) sont en état quiescent avec des prolongements fins et ramifiés caractéristiques et présentent une très faible colocalisation avec la TSPO (vert) (**Figure III-3-10A**). Des astrocytes (rouge) présentent une morphologie normale telle que classiquement représentée avec une forme d'étoile et des branches fines et ne sont pas colocalisées avec la TSPO (vert) (**Figure III-3-10B**). La TSPO est principalement colocalisée avec des cellules endothéliales (rouge) à l'état basal (**Figure III-3-10C**). La forme de TSPO est soit allongée soit ronde, en fonction de la forme des vaisseaux représentés sur la coupe.

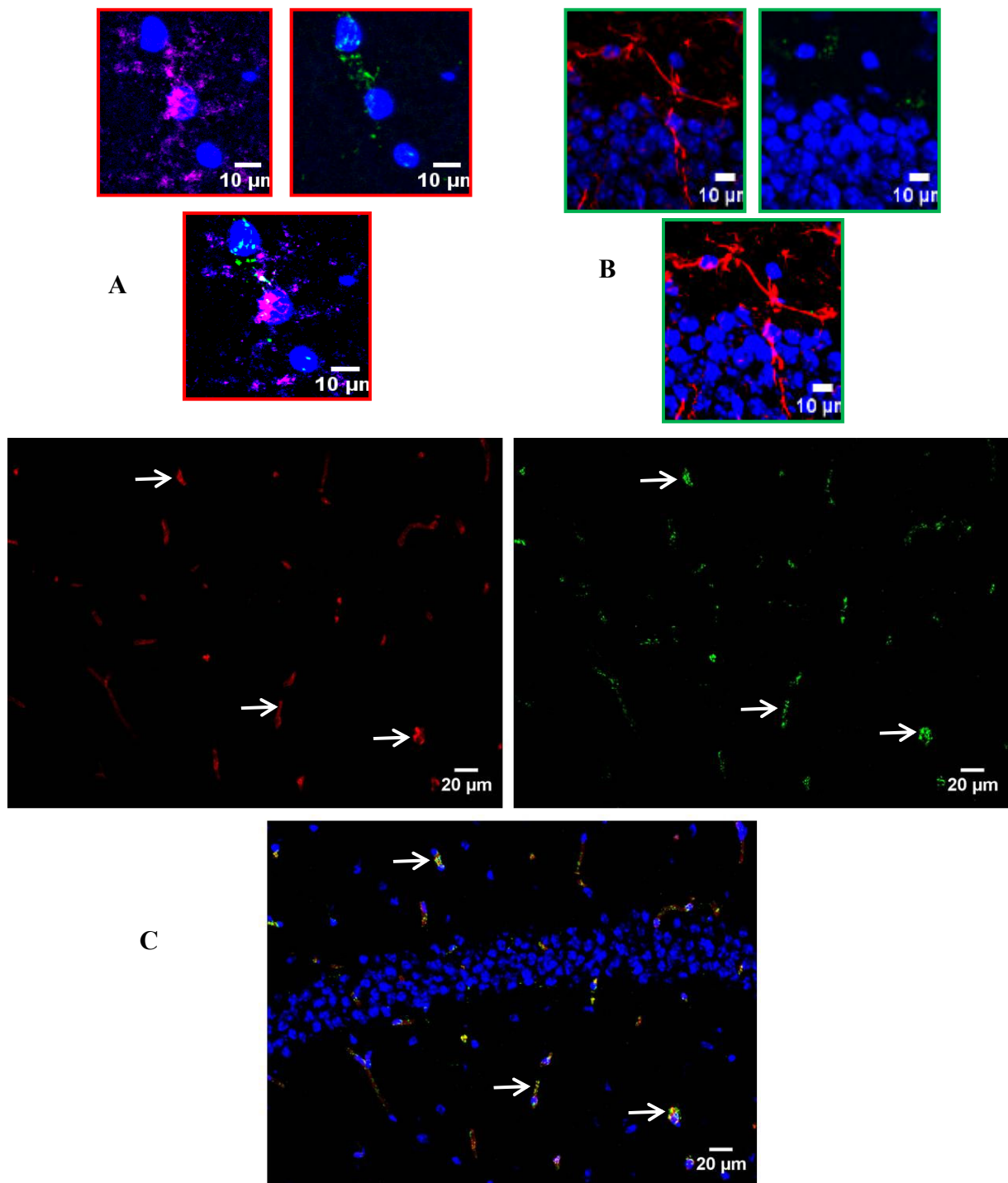


Figure III-3-11. Colocalisation entre TSPO et différents types de cellules à l'état basal. La TSPO est faiblement colocalisée avec des microglies (A), peu avec des astrocytes (B) et beaucoup avec des cellules CD31 positives (C) (flèches blanches).

A partir de 3 jours après injection d'AK, nous commençons à observer une augmentation du signal du TSPO (vert) venant principalement des cellules microgliales activées (magenta). La densité astrocytaire (rouge) augmente également mais reste encore avec sa forme habituelle et n'est pas colocalisée avec la TSPO (**Figure III-3-12**).

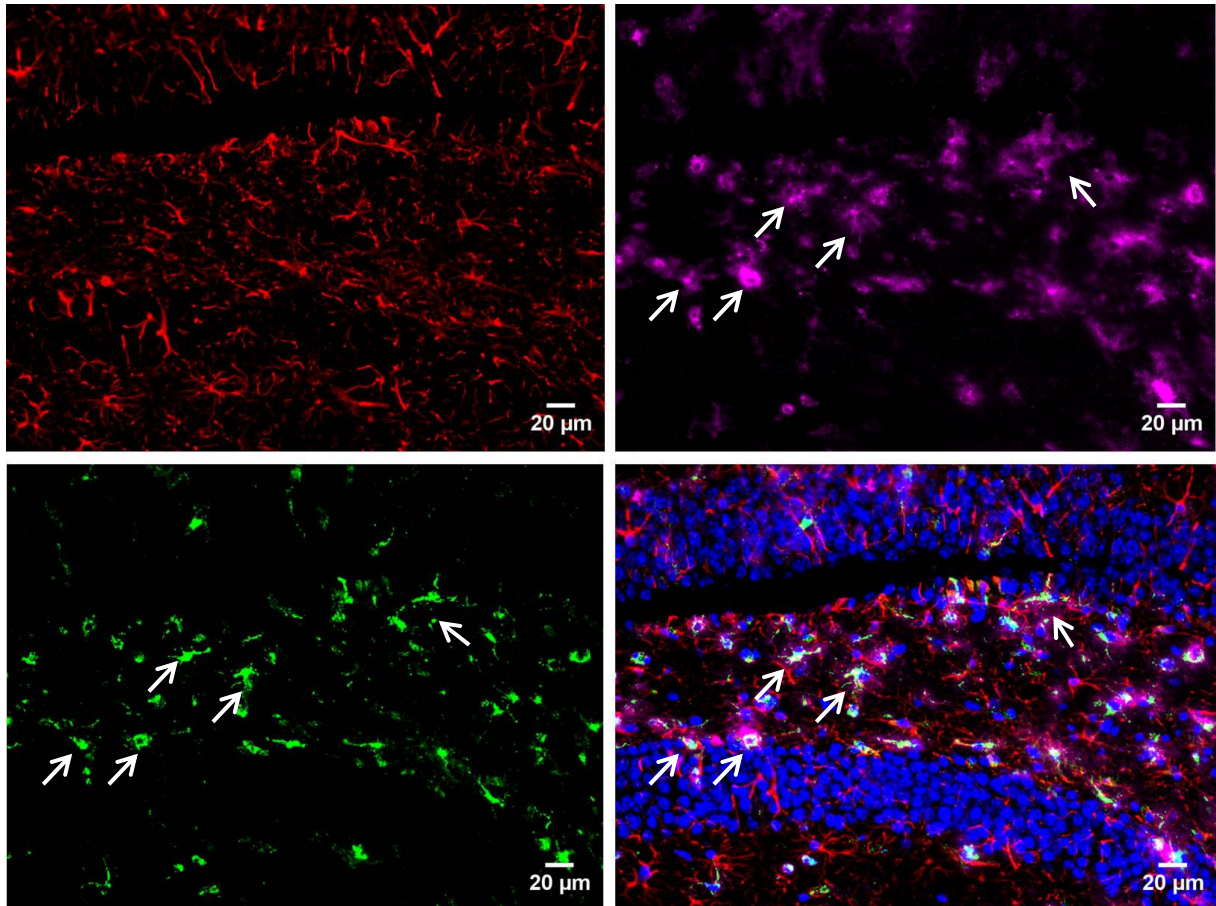


Figure III-3-12. Image de triple marquage GFAP (rouge) / CD11b (magenta) / TSPO (vert) prise au niveau du hile de l'hippocampe ipsilatéral à 3 jours après injection d'AK. Des flèches blanches représentent une bonne colocalisation entre CD11b et TSPO.

A 7 jours après injection d'AK, les cellules microgliales activées présentent des corps cellulaires denses surexprimant la TSPO se situant essentiellement dans le hile et la couche pyramidale de CA3 de l'hippocampe ipsilatéral. Les astrocytes présentent des corps cellulaires hypertrophiés surexprimant la TSPO (**figure III-3-13A**). Dans l'hippocampe controlatéral, la

surexpression de TSPO est observée dans des microglies activées qui n'entrent pas dans la couche pyramidale (**figure III-3-13B**).

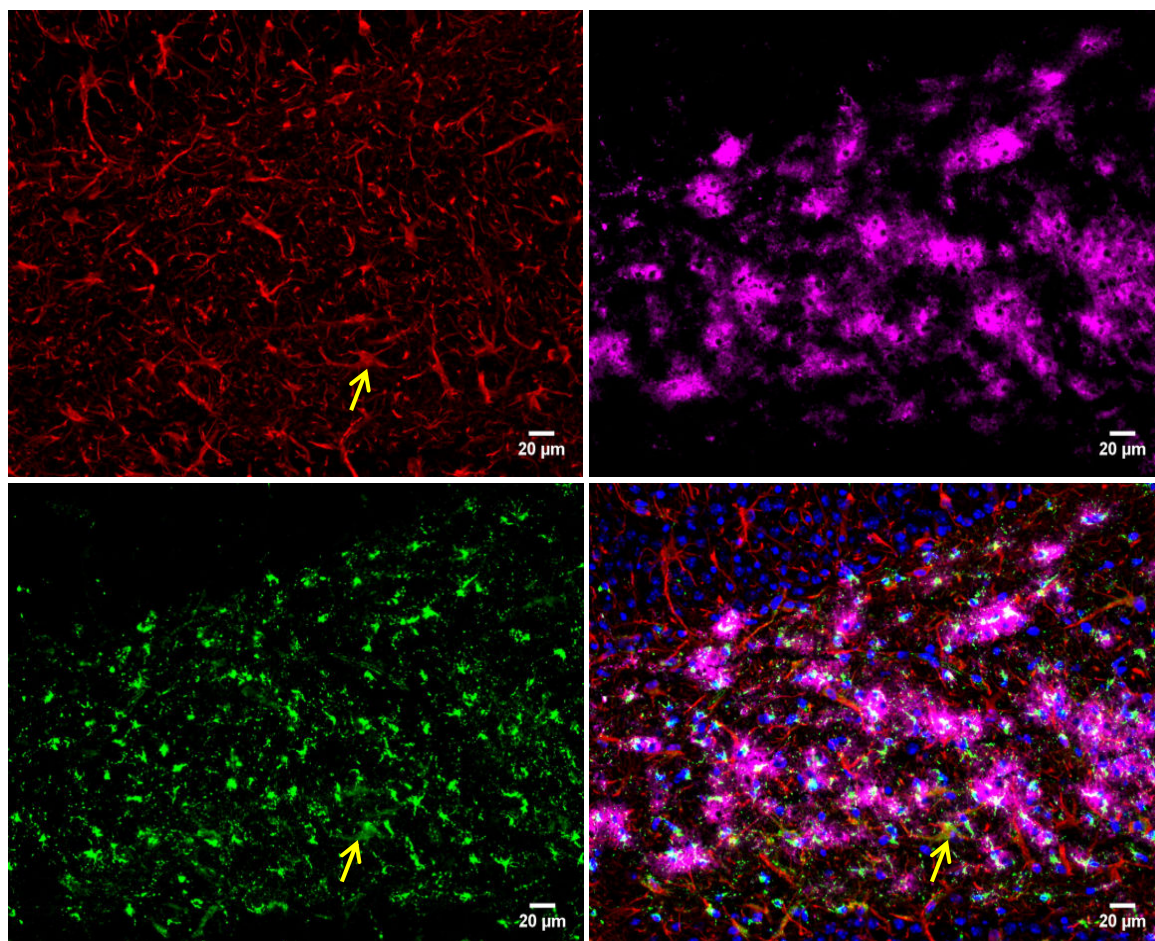


Figure III-3-13A. Image de triple marquage GFAP (rouge) / CD11b (magenta) / TSPO (vert) prise au niveau du hile de l'hippocampe ipsilatéral à 7 jours après injection d'AK. La flèche jaune montre une bonne colocalisation entre GFAP et TSPO.

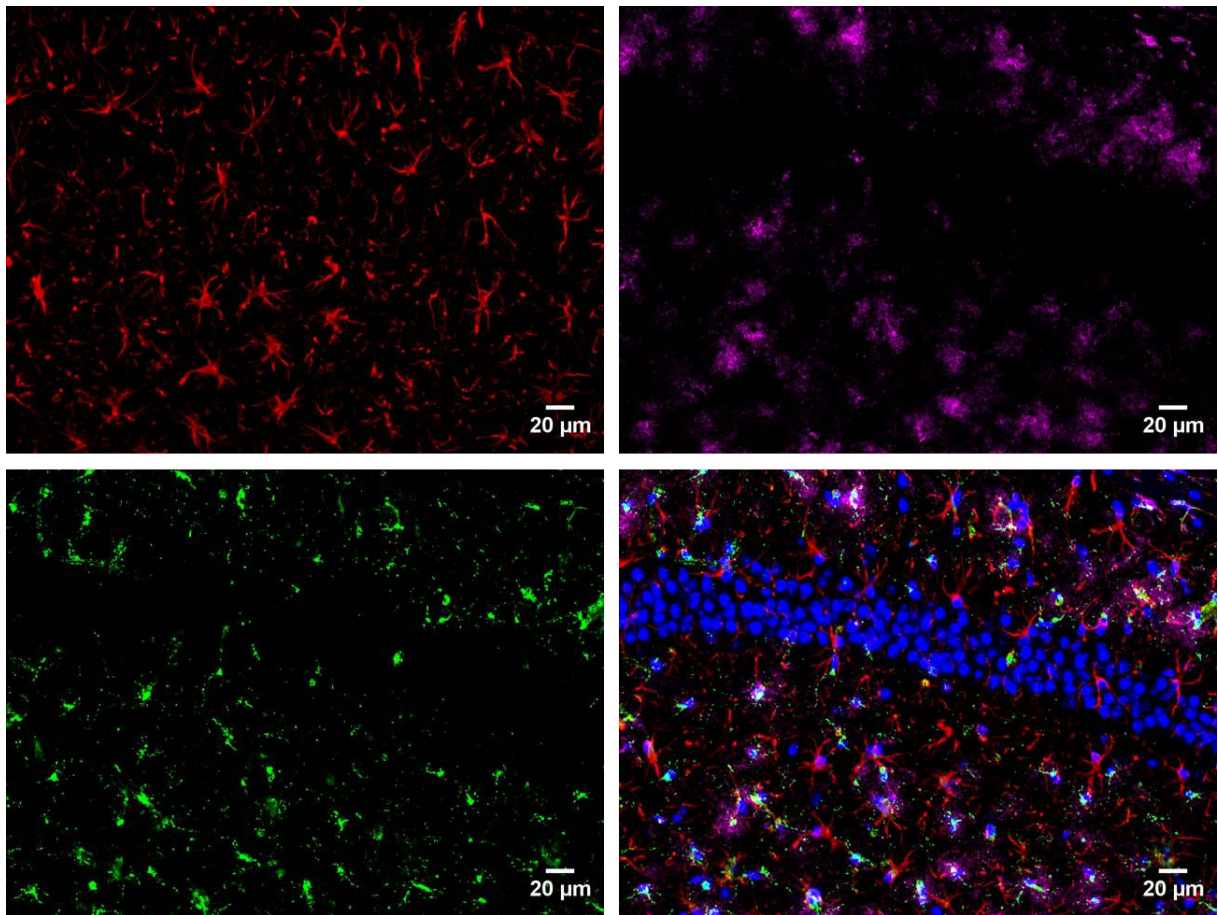


Figure III-3-13B. Image de triple marquage GFAP (rouge) / CD11b (magenta) / TSPO (vert) prise au niveau de CA1 de l'hippocampe controlatéral à 7 jours après injection d'AK. Des microglies activées surexprimant la TSPO n'entraient pas dans la couche pyramidale (bleu).

Entre 14 jours et 1 mois après injection d'AK, des microglies activées surexprimant la TSPO persistent au niveau de CA1 de l'hippocampe ipsilatéral (**Figure III-3-14A**) alors qu'elles diminuent au niveau du hile (**Figure III-3-14B**). Le nombre des astrocytes dans le même temps augmente et leurs corps cellulaires apparaissent hypertrophiés surexprimant la TSPO, essentiellement au sein de la couche granulaire (**Figure III-3-14B**).

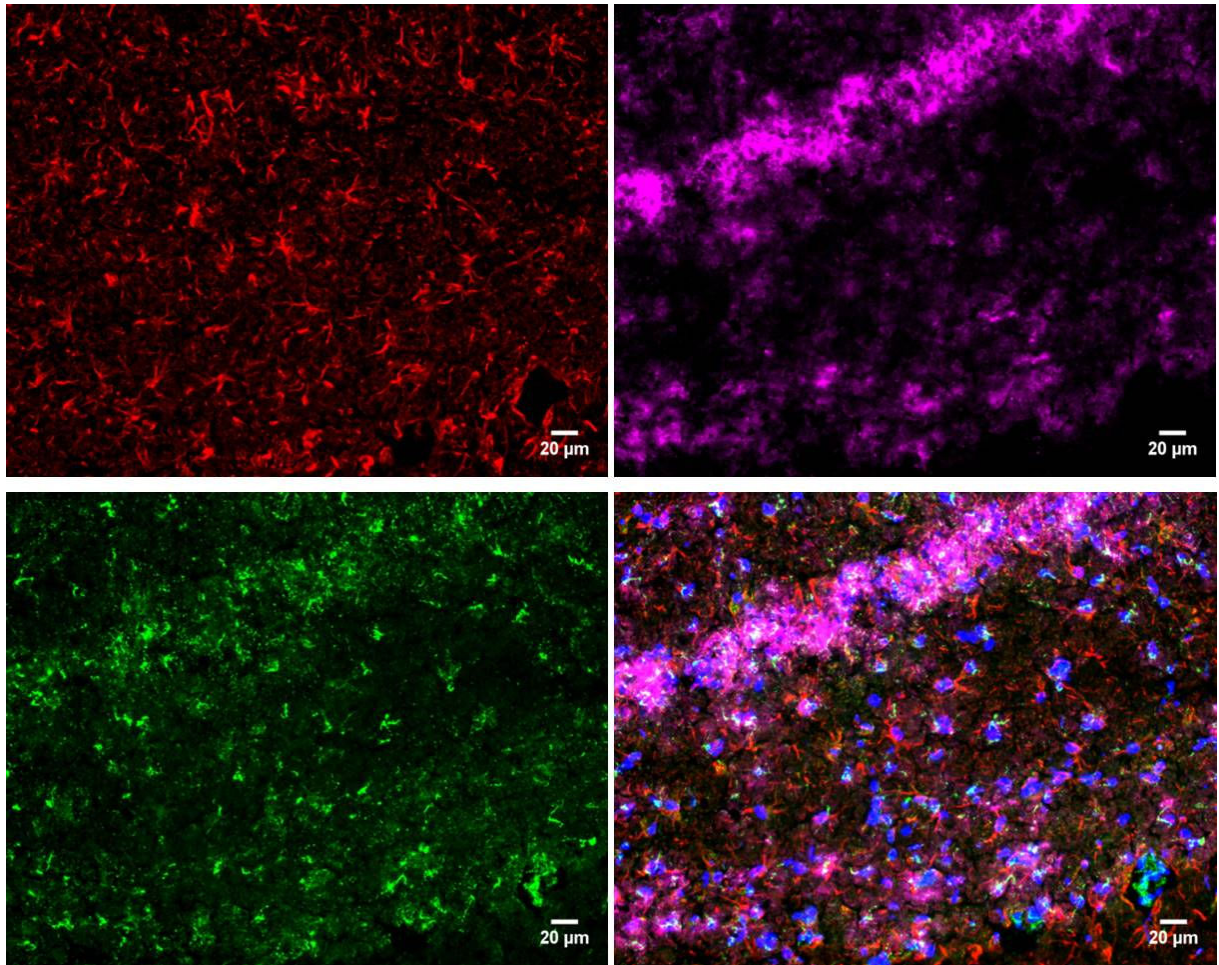


Figure III-3-14A. Image de triple marquage GFAP (rouge) / CD11b (magenta) / TSPO (vert) prise au niveau de CA1 de l'hippocampe ipsilatéral à 14 jours après injection d'AK montrant une persistance des microglies activées surexprimant la TSPO dans la zone de mort neuronale.

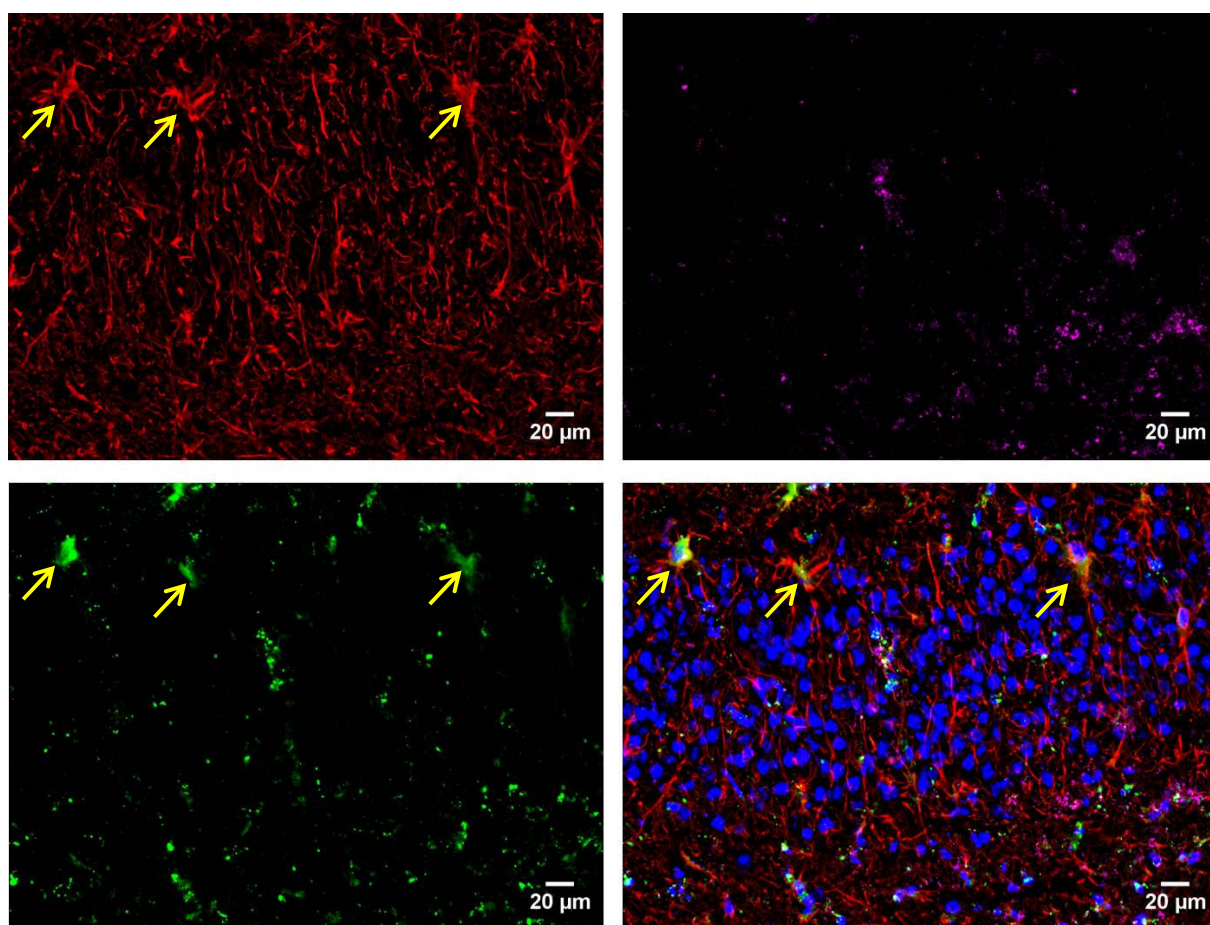


Figure III-3-14B. Image de triple marquage GFAP (rouge) / CD11b (magenta) / TSPO (vert) prise au niveau du hile de l'hippocampe ipsilatéral à 14 jours après injection d'AK. Des flèches jaunes montrent une bonne colocalisation entre GFAP et TSPO dans la couche granulaire.

A 6 mois après injection d'AK, la surexpression de TSPO se situe dans des astrocytes, qui constituent une zone cicatricielle en lieu et place des cellules pyramidales disparues, mais aussi au sein de la couche préservée mais dispersée des grains. A ce niveau les astrocytes présentent un corps cellulaire hypertrophié. Des cellules CD11b positives d'aspect rond, amiboïde, qui ne permet pas de distinguer entre microglie activée ou macrophage, sont également trouvées dans la zone

cicatricielle surexprimant la TSPO (**Figure III-3-15A**). Une hypervascularisation a été observée à ce temps de l'injection (**Figure III-3-15B**).

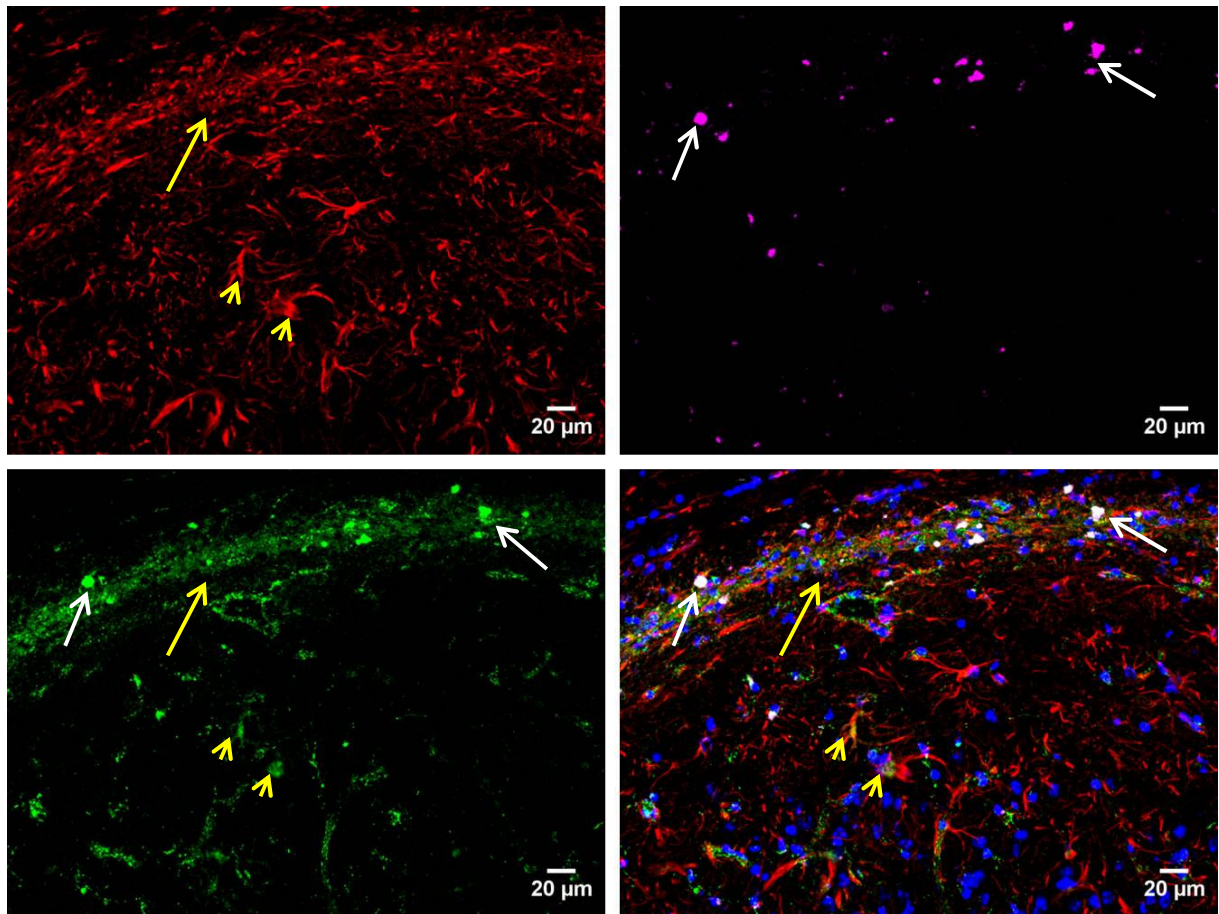


Figure III-3-15A. Image de triple marquage GFAP (rouge) / CD11b (magenta) / TSPO (vert) prise au niveau de la sclérose hippocampique à 6 mois après injection d'AK. La flèche jaune montre la cicatrice astrocytaire surexprimant la TSPO. Les pointes de flèches jaunes montrent une bonne colocalisation entre GFAP et TSPO dans la couche granulaire. Les flèches blanches montrent des cellules CD11b positives surexprimant la TSPO.

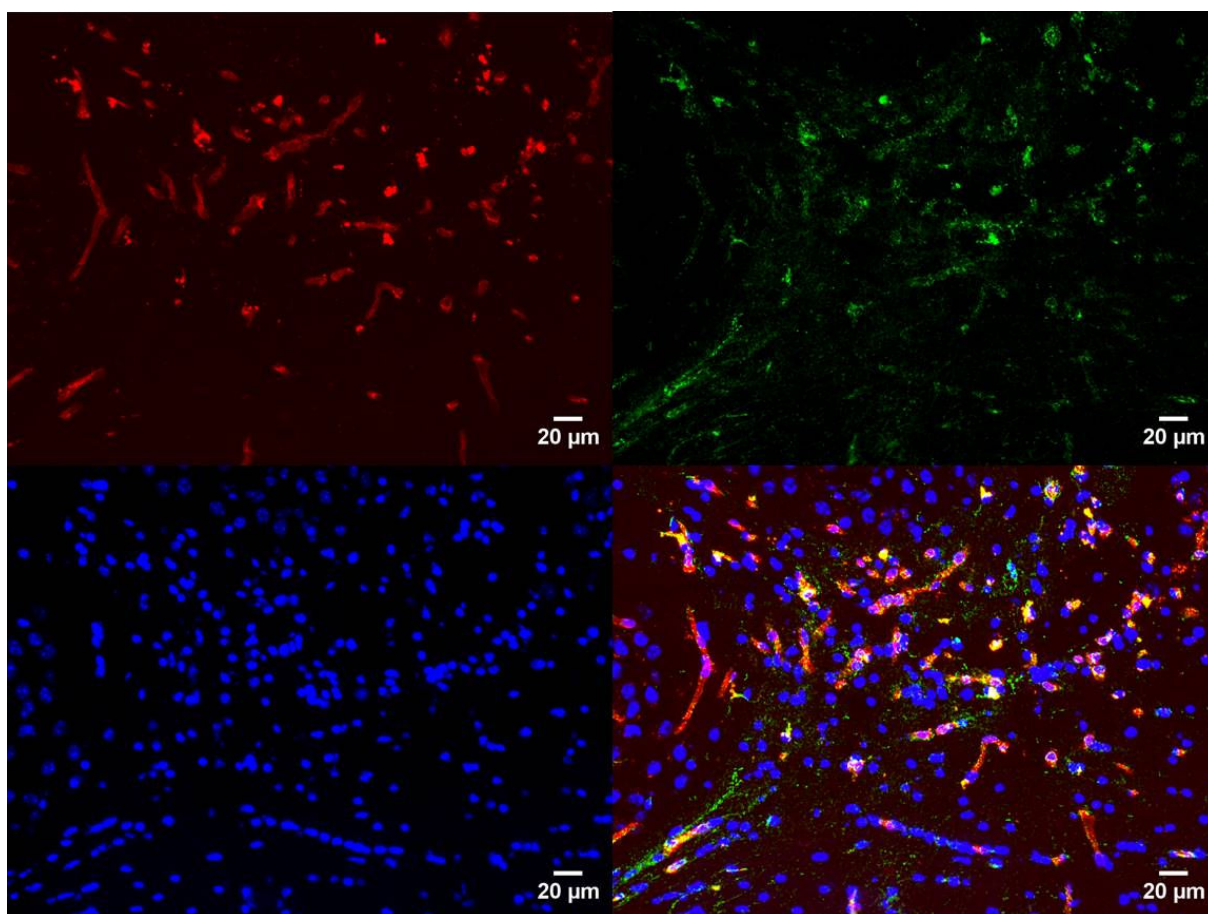


Figure III-3-15B. Image de double marquage CD31 (rouge) / TSPO (vert) prise au niveau de la zone cicatricielle de la SH à 6 mois après injection d'AK montrant une hypervascularisation dans la SH.

3.5. Caractérisation des signaux TSPO extrahippocampiques par immunofluorescence

Des foyers d'hypersignaux extrahippocampiques découverts sur l'autoradiographie ont été confirmés par l'immunohistofluorescence. La **figure III-3-16A** montre une accumulation des microglies activées surexprimant la TSPO au niveau du noyau latéral du thalamus et la **Figure III-3-16B** au niveau du noyau basolatéral de l'amygdale.

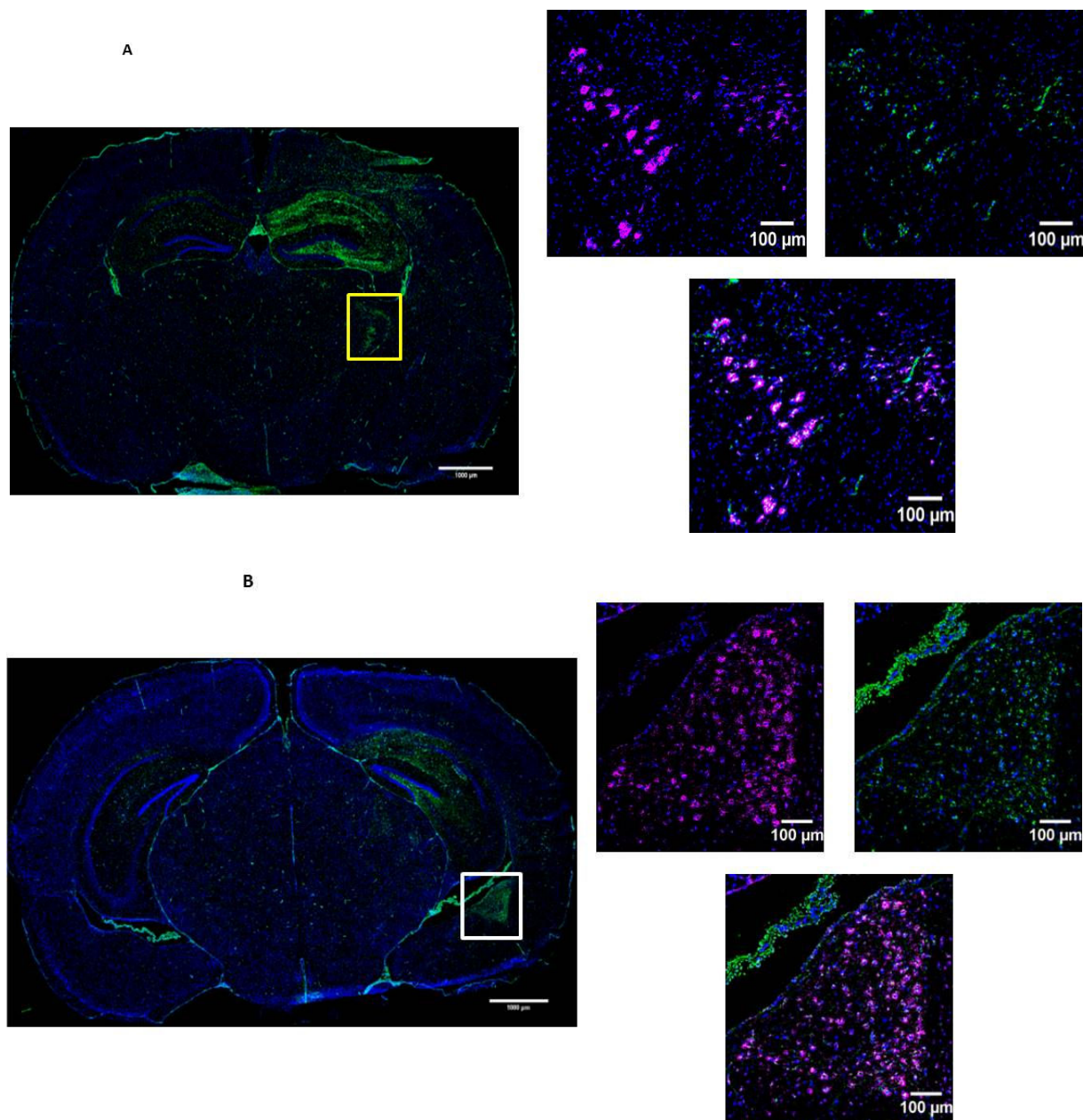


Figure III-3-16. Images de double marquage CD11b (magenta) et TSPO (vert) montrant le foyer hypersignal au niveau du noyau latéral du thalamus (carré jaune, A) et du noyau d'amygdale basolatérale (carré blanc, B) sur la coupe du cerveau de souris à 7 jours après injection d'AK. Noyau DAPI (bleu).

4. Discussion

4.1. Faisabilité de la TEP ^{18}F -DPA-714 longitudinale pour suivre la neuroinflammation impliquée dans la constitution de la sclérose hippocampique chez la souris

Notre étude a démontré la faisabilité de la TEP ^{18}F -DPA-714 pour visualiser et suivre la neuroinflammation même dans une petite structure comme l'hippocampe lésé de souris jusqu'à 6 mois après induction du modèle. Nous avons aussi observé un signal TEP élevé dans l'ensemble du cerveau aux temps précoces (3 jours et 7 jours après injection d'AK). Ce signal élevé diffus (observé même dans le striatum et le cervelet) est possiblement lié à une réaction globale inflammatoire au niveau cérébrale lié à l'injection d'AK puisque non observé chez les animaux contrôles ou est dû à la contamination par le signal élevé de l'hippocampe lésé.

Ici, nous nous concentrerons sur la comparaison de l'évolution du signal TEP au niveau de la sclérose hippocampique à ceux observés pour d'autres modèles d'épilepsie ou de neuroinflammation localisée décrits dans la littérature.

Concernant l'inflammation observée au niveau de la sclérose hippocampique, des résultats similaires ont été mis en évidence chez des rats épileptiques après induction de la pathologie par injection systémique d'AK (Amhaoul *et al.* 2015) ou de pilocarpine (Brackhan *et al.* 2016). Globalement, le signal TEP inflammatoire (^{18}F -PBR111 ou ^{11}C -PK11195 respectivement) atteint un pic durant la période d'épileptogénèse et diminue au cours du temps dans la période d'ictogénèse en fonction du modèle. Cette évolution est résumée dans la figure suivante (**figure III-4-1**).

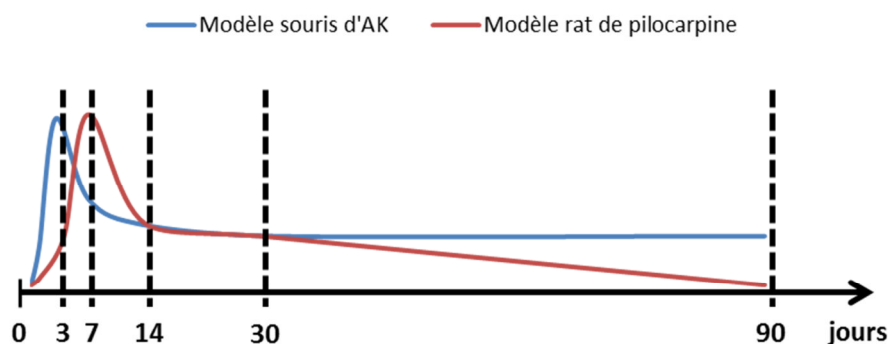


Figure III-4-1. Allure de l'évolution de la fixation TEP (%ID/cc) chez les modèles de souris AK (courbe bleue) et de rat pilocarpine (courbe rouge) au niveau de l'hippocampe sclérotique. Ces courbes ont été tracées en fonction de nos résultats et de la description de l'évolution temporelle du modèle de rat pilocarpine rapportée dans (Brackhan *et al.* 2016). L'intensité est sans unité et n'est pas comparable d'une courbe à l'autre.

4.1.1. Différence au temps précoce

Nous posons différentes hypothèses pour expliquer la différence de position du pic de fixation du radiotracer TSPO entre le modèle souris induit par injection intrahippocampique d'AK et le modèle rat induit par injection systémique de pilocarpine.

La première hypothèse est que la fixation du radiotracer TSPO puisse dépendre de l'intégrité de la BHE. Breuer (Breuer 2016) a démontré dans sa thèse une rupture de la BHE dans ces deux modèles en utilisant l'IRM au Gadolinium. L'évolution du signal T1 au Gadolinium est résumée dans la figure suivante.

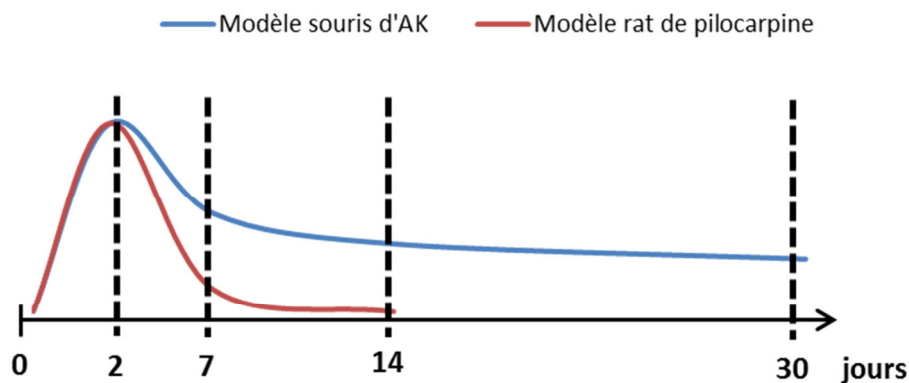


Figure III-4-2. Allure de l'évolution du signal T1 Gadolinium entre le modèle de souris AK (courbe bleue) et le modèle de rat pilocarpine (courbe rouge) au niveau de l'hippocampe sclérotique. Ces courbes ont été tracées en fonction de la description de l'évolution temporelle rapportée dans (Breuer 2016). L'intensité est sans unité et n'est pas comparable d'une courbe à l'autre.

Dans le modèle souris d'AK, le pic du T1 Gadolinium est à 2 jours après injection d'AK et correspond au pic de fixation du ^{18}F -DPA-714 à 3 jours dans notre étude. La diminution progressive du signal T1 Gadolinium est d'allure similaire à celle de ^{18}F -DPA-714. Cette allure similaire renforce l'hypothèse que la rupture de la BHE pourrait contribuer pour partie au signal de fixation du radiotraceur TSPO.

Le pic du signal du radiotraceur TSPO a été également trouvé à 4 jours après injection d'acide quinolinique (produit excitotoxique) dans le striatum du rat (Arlicot et al. 2014). L'auteur a expliqué ce pic plutôt par la rupture de BHE parce que le signal n'était pas localisé au niveau de l'injection mais avait diffusé dans l'hémisphère ipsilatéral. Comme dans notre étude, le signal à 3 jours était très étendu, même jusqu'à la zone controlatérale, possiblement en raison de l'état de mal pouvant entraîner une rupture de BHE bilatérale, comme démontré par Breuer et al. (Breuer 2016).

L'absence du radiométabolite du ^{18}F -DPA-714 n'a été démontrée que dans le cerveau de la souris normale. Une rupture de la BHE permet potentiellement à des radiométabolites de traverser et d'entrer dans le cerveau. En raison des difficultés techniques, aucune étude de radiométabolites n'a été réalisée dans cette condition. La limite du paramètre semi-quantitatif %ID/cc que nous utilisons réside aussi dans le fait que la captation du traceur est influencée par des facteurs tels que la perfusion tissulaire ou l'intégrité de la BHE. La **figure III-3-4** illustre cependant la spécificité du signal TSPO dans l'ensemble du cerveau par un déplacement à 60 minutes.

Pour les études d'imagerie de la TSPO chez la souris, il n'existe actuellement pas de meilleure méthode de quantification que celle présentée dans cette étude. Premièrement, en raison du petit volume sanguin de la souris, il est impossible d'obtenir un prélèvement sanguin artériel qui permettrait de générer une fonction d'entrée, et deuxièmement, il n'existe pas de région de référence appropriée en raison de l'expression omniprésente de TSPO, même à l'état basal, dans le cerveau sain, par des cellules endothéliales (Notter *et al.* 2017, Veronese *et al.* 2017).

Malgré ces limitations, le %ID/cc est le paramètre le plus utilisé par différents auteurs pour des études chez la souris. En effet, une augmentation de captation de ^{18}F -DPA-714 peut être détectée dans le tronc cérébral de souris atteintes de sclérose latérale amyotrophique (Gargiulo *et al.* 2016) ou de lésion traumatique cérébrale (Israel *et al.* 2016). Dans un modèle de souris Alzheimer, des captations élevées de ^{18}F -PBR06 (James *et al.* 2015) ou de ^{11}C -PBR28 (Mirzaei *et al.* 2016) peuvent aussi être visualisées et quantifiées dans le cortex et les hippocampes au moyen de cette approche.

La deuxième hypothèse pourrait être une raison liée à la pathologie épileptique. En effet, chez le modèle rat pilocarpine, le pic de T1 Gadolinium a été aussi retrouvé à 2 jours après injection de pilocarpine alors que le pic de fixation du radiotraceur TSPO était atteint à 7 jours. De la même

manière, dans le modèle LPS intracérébral chez le rat, le pic de signal de l'IRM après injection de Gadolinium a été retrouvé à 1 jour après injection de LPS alors que le pic de fixation du radiotracer TSPO était observé à 4 jours (Ory *et al.* 2016). Ces arguments suggèrent d'autres raisons contribuant au pic précoce de la fixation du radiotracer TSPO en fonction des modèles en dehors de la rupture de la BHE.

La durée de l'état de mal peut être une des raisons contribuant au pic de fixation du radiotracer TSPO à des temps précoces. Dans notre étude, nous n'avons pas analysé profondément l'état de mal mais selon différentes équipes utilisant ce modèle, l'état de mal disparaissait spontanément après une durée de 48h. Un pic d'inflammation à 3 jours, soit 24h après la disparition de l'état de mal pourrait avoir un lien avec cet état de mal. Au contraire, l'état de mal chez le modèle rat pilocarpine, étant beaucoup plus sévère et diffus, pour que l'animal survive, il doit être stoppé par administration de diazepam. L'arrêt précoce de l'état de mal ou l'administration de benzodiazépine pourrait expliquer la cinétique du signal inflammatoire dans ce modèle.

L'excitabilité neuronale entraînant un recrutement précoce des microglies activées pourrait être aussi une des raisons du pic précoce à 3-4 jours (Eyo *et al.* 2017). Cette discussion sera détaillée dans la partie suivante sur l'immunofluorescence des microglies. En effet, l'injection des produits excitotoxiques tels que l'AK ou l'acide quinolinique entraîne un pic précoce de l'inflammation. Une excitation neuronale a été aussi démontrée lors d'une administration locale de LPS (Rodgers *et al.* 2009) qui pourrait contribuer au pic précoce de l'inflammation. Au contraire, dans des modèles de morts neuronales sans excitabilité neuronale comme le modèle d'ischémie, le pic inflammatoire précoce n'a pas été retrouvé (Martin *et al.* 2010). L'évolution du signal TEP inflammatoire au cours du temps de ces modèles est résumé dans la **figure III-4-3**

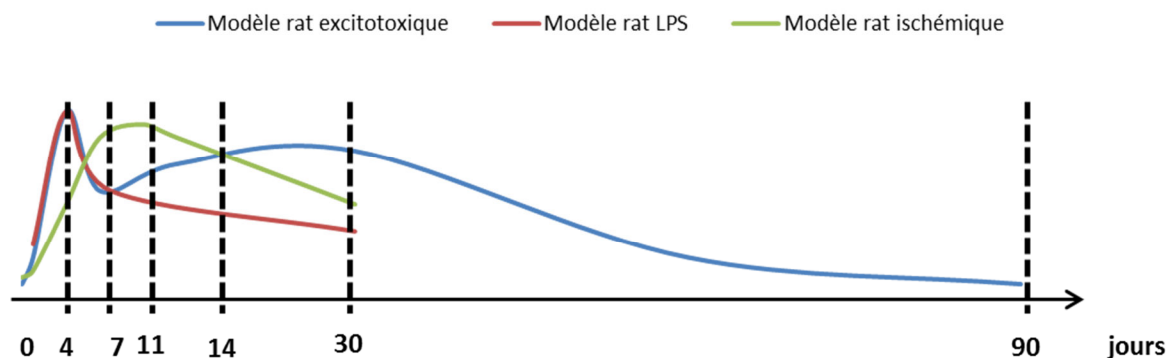


Figure III-4-3. Allure de l'évolution du signal du radiotraceur TSPO entre différents modèles neuroinflammatoires :

- modèle de rat excitotoxique (courbe bleue) (Arlicot et al. 2014) montrant le pic à 4 jours au niveau du striatum injecté, suivi d'un haut plateau du signal entre 4 et 30 jours correspondant à la mort neuronale et revenant à l'état basal à 90 jours;
- modèle du rat LPS (courbe rouge) (Ory *et al.* 2016) montrant un pic à 4 jours correspondant à l'activation précoce des microglies en réponse au LPS au niveau du striatum injecté, mais aussi potentiellement à l'excitation neuronale et montrant aussi une tendance descendante rapide en raison d'absence de mort neuronale dans ce modèle;
- modèle de rat ischémique (courbe verte) (Martin *et al.* 2010) montrant un pic à 11 jours dans la région d'infarctus correspondant à la mort neuronale importante suite à une ischémie cérébrale, sans pic inflammatoire précoce.

Ces courbes ont été tracées en fonction de la description de leurs évolutions temporelles.

L'intensité est sans unité et n'est pas comparable d'une courbe à l'autre.

4.1.2. Différence au temps tardif

Notre étude a démontré une persistance du signal TEP ^{18}F -DPA-714 au niveau de la sclérose hippocampique même à 6 mois après injection d'AK qui est cohérente avec des observations faites par imagerie TEP utilisant le ^{11}C -PBR28 chez des patients atteints d'une épilepsie du lobe temporal avec une sclérose hippocampique (Hirvonen *et al.* 2012). La différence par rapport aux modèles d'épilepsie chez le rat pourrait être expliquée par l'induction hautement reproductible de la sclérose hippocampique dans le modèle de souris comparée à la faible reproductibilité de cette lésion chez le modèle de rat.

La persistance du signal ^{18}F -DPA-714 pourrait être également liée à la persistance des crises spontanées pendant toute la vie de la souris dans ce modèle d'AK intra hippocampique. Dans notre étude, nous n'avons pas réalisé une surveillance d'EEG, cependant, de nombreuses études précédentes ont montré que toutes les souris avec sclérose hippocampique induite par injection d'AK présentent une fréquence élevée de crises épileptiques pharmacorésistantes (Bouilleret *et al.* 1999, Heinrich *et al.* 1998, Riban *et al.* 2002). En outre, des études chez le rat ont montré une relation entre TSPO et la fréquence des crises. De plus, dans un modèle induit par stimulation électrique locale de l'amygdale, une augmentation de la TSPO a été trouvée seulement chez des rats présentant une pharmacorésistance avec une haute fréquence d'apparition des crises (Bogdanovic *et al.* 2014).

Dans notre étude, nous avons fait un suivi des souris entre 4 mois et 10 mois, et durant cette période, nous avons également étudié l'impact de l'âge sur la captation basale de TSPO. Aucune différence significative n'a été trouvée au niveau des hippocampes entre des souris témoins âgées de 10 mois et des souris à l'état basal âgées de 4 mois. Dans d'autres études s'intéressant au vieillissement, il a été montré un signal élevé de TSPO chez des souris C57Bl6 âgées de 26 mois en utilisant le ^{18}F -GE180 (Liu *et al.* 2015). L'absence de signal TSPO élevé chez les jeunes a été

confirmé par une étude de souris Alzheimer où aucune différence significative n'a pu être observée chez des souris de type de sauvage (C57Bl6) entre 5 à 6 mois et 15 à 16 mois, ou même chez des souris Alzheimer transgéniques de 5 à 6 mois. Le signal élevé de ^{18}F -PBR06 n'a été observé que dans le cortex et les hippocampes chez des souris Alzheimer transgéniques de 15 à 16 mois (James *et al.* 2015).

En comparant différents modèles neuroinflammatoires, la **figure III-4-4** résume l'ensemble des hypothèses pouvant expliquer l'évolution temporelle des signaux TEP inflammatoires dans le modèle de souris épileptique. Les études utilisant l'autoradiographie et l'immunofluorescence que nous avons réalisées ont cherché à clarifier ces hypothèses.

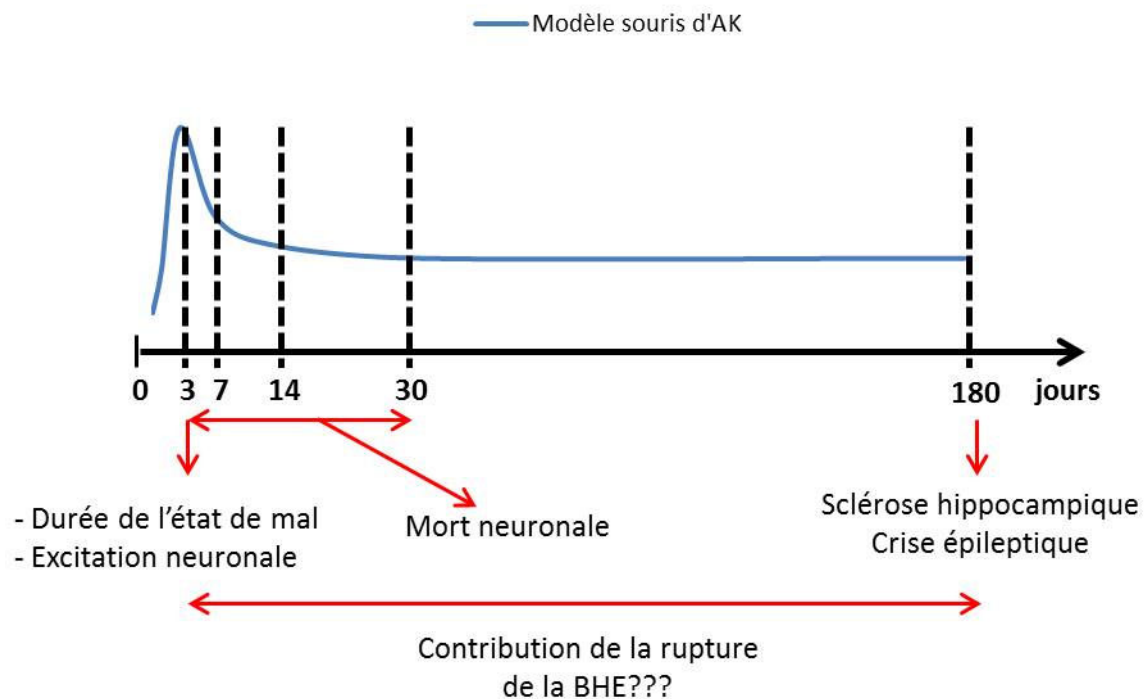


Figure III-4-4. Résumé de différentes hypothèses expliquant l'évolution de la fixation ^{18}F -DPA-714 durant la constitution de la sclérose hippocampique chez le modèle souris d'épilepsie.

4.2. Autoradiographie au ^{18}F -DPA-714 confirmant le signal TEP TSPO dans la sclérose hippocampique

Limites de quantification. Notre étude par autoradiographie est sous-optimale en termes de quantification. Tout d'abord, concernant la **quantification absolue**, nous n'avons pas réussi à faire une courbe de calibration avec le radionucléide ^{18}F comme on peut le faire avec du tritium (^3H). Cependant, même avec une courbe de calibration, une captation du ^{18}F -DPA-714 variant entre différentes coupes rendent les mesures difficiles. La **figure III-4-5** montre une variation de captation du signal entre différentes coupes d'épaisseur de $10\mu\text{m}$, séparées de $10\mu\text{m}$ au niveau de l'hippocampe dorsal d'une souris AK à 14 jours après injection : (A) avant normalisation, (B) après normalisation par l'intensité moyenne de la coupe entière. Avant normalisation, le rapport entre l'écart-type et la moyenne de la région de l'hippocampe droit sur 5 coupes est 40%, alors qu'après normalisation, ce rapport diminue à 10%. Cette variation entre coupes peut être liée à la variation de l'épaisseur de coupe liée à une imperfection de notre Cryostat.

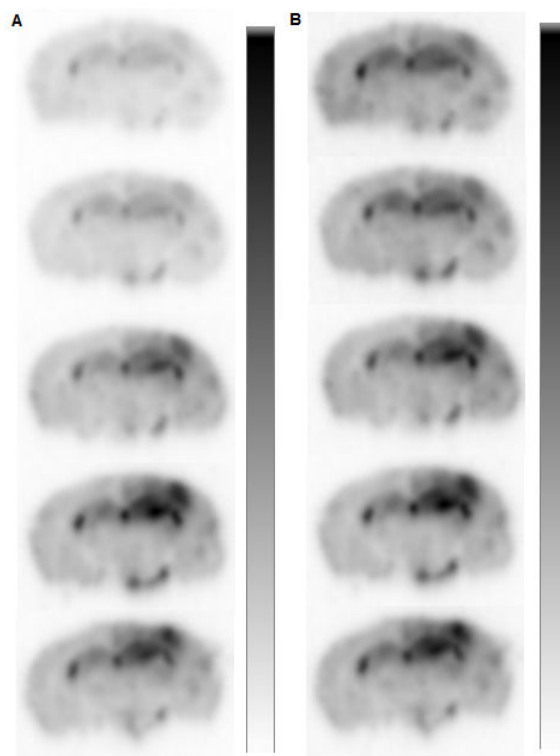


Figure III-4-5. Variation de captation du signal entre différentes coupes de $10\mu\text{m}$ d'épaisseur, séparées de $10\mu\text{m}$ au niveau de l'hippocampe dorsal d'une souris AK à 14 jours après injection.

Une deuxième limite concerne l'**analyse semi-quantitative**. Une région controlatérale est souvent utilisée comme la zone de référence pour des modèles de neuroinflammation localisée

(Arlicot *et al.* 2014, Ory *et al.* 2016). Cependant, dans notre modèle d'épilepsie, même avec une lésion localement induite, des crises épileptiques peuvent affecter n'importe quelle région corticale et sous-corticale dans le cerveau. Dans notre étude, nous avons trouvé un fort signal TEP dans l'ensemble du cerveau, même dans le cervelet à 3 jours après injection d'AK (**figure III-3-3**). Dans le modèle d'épilepsie chez le rat, un fort signal TEP pouvait être observé dans l'ensemble du système limbique à 7 jours après induction (Brackhan *et al.* 2016).

Il n'existe pas actuellement de zone de référence validée dans ce modèle. Pour surmonter ce problème, nous avons sélectionné le signal moyen du cerveau entier comme la zone de référence avec une hypothèse selon laquelle le signal moyen de cette grande région (environ 100 fois plus que la région des hippocampes et 1000 fois plus que le signal des régions ventriculaires) reflète principalement le signal non spécifique de chaque coupe. En utilisant cette méthode, nous avons également limité la variation de captation du signal entre les coupes comme démontré ci-dessus. Cependant, le biais possible est une sous-estimation du signal spécifique aux temps précoces à 3 jours et à 7 jours où le signal non spécifique est fort et diffus dans le cerveau entier.

Malgré toutes ces limites, nous avons confirmé que le signal TSPO est élevé dans l'hippocampe lésé aux différents moments, même à 6 mois après induction. L'évolution des signaux d'autoradiographie et de la TEP est résumée dans la figure suivante (**figure III-4-6**).

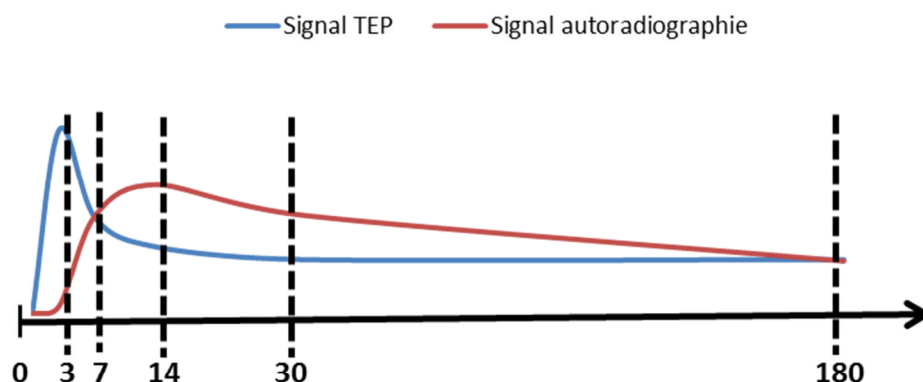


Figure III-4-6. Allure de l'évolution du signal TEP et autoradiographie au ^{18}F -DPA-714 au

cours du temps dans l'hippocampe lésé dans un modèle d'épilepsie chez la souris. L'intensité est sans unité et n'est pas comparable d'une courbe à l'autre.

En dehors de la sous-estimation du signal d'autoradiographie à 3 jours, nous avons également trouvé un signal TSPO élevé (TEP, autoradiographie) entre 7 jours et 1 mois dans l'hippocampe lésé concordant avec d'autres modèles de neuroinflammation dans lesquelles le haut signal TSPO correspond à une mort neuronale recrutant des microglies activées dans cette période (Arlicot *et al.* 2014, Martin *et al.* 2010).

Cependant, dans le modèle d'excitotoxique (Arlicot *et al.* 2014), le signal TSPO revient à l'état basal à 90 jours après induction et dans le modèle d'ischémie cérébrale (Martin *et al.* 2010), le signal TSPO était également descendu à 30 jours, alors que celui dans l'hippocampe lésé reste élevé jusqu'à 6 mois après induction évoquant une relation entre la neuroinflammation et la SH.

En résumé, malgré des limites dans notre approche de quantification, l'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 a confirmé le signal TSPO élevé détecté par la TEP durant la constitution de la SH puis après que la SH soit bien établie. La prochaine partie discute l'évolution de différents types de cellules gliales dans la constitution de la SH.

4.3. Origine du signal TSPO venant successivement d'une activation initialement microgliales puis astrocytaires

Nous avons démontré que la TSPO peut venir de différents types de cellules : microglies activées, astrocytes activées, et cellules endothéliales. Nous avons démontré que l'activation gliale est composante dans la constitution de la SH. Sa relation avec l'évolution du signal TEP est résumée dans la **figure III-4-7**.

Nous avons également observé une augmentation de la densité vasculaire dans la SH à 6 mois après injection. Cependant, l'évolution des cellules endothéliales durant la constitution de la SH reste encore à étudier. En parallèle, nous essayons de distinguer le signal TEP TSPO d'origine endothéliale et gliale en posant avec l'hypothèse que la BHE crée une différence de cinétique de captation entre ces deux « types » de la TSPO.

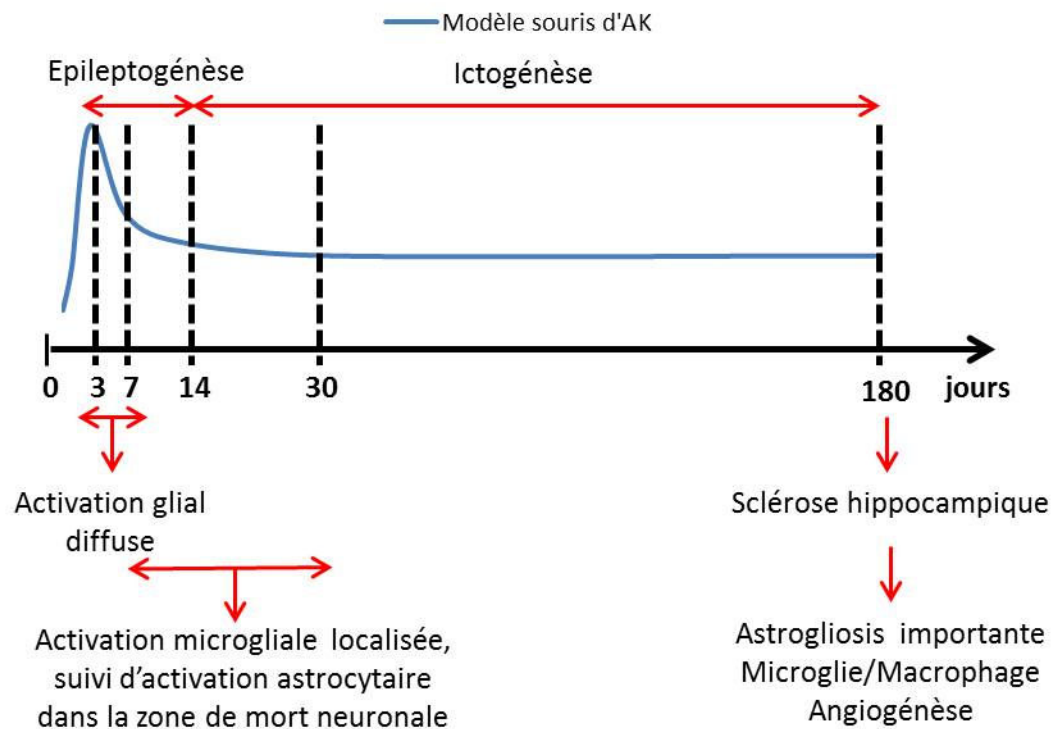


Figure III-4-7. Schéma résumant la relation entre l'évolution de l'activation gliale et celle de la TEP TSPO durant l'épileptogénèse et l'ictogénèse.

4.3.1. Epileptogénèse

C'est une période importante décrite dans différents modèles d'épilepsie puisque de nombreuses études ont révélé différents mécanismes dont la neuroinflammation qui participent à la transformation d'un cerveau sain en cerveau épileptique. En fonction de la distribution de l'activation gliale, nous posons l'hypothèse de deux fonctionnements différents de cette activation.

4.3.1.1. Effets néfastes des microglies

Une activation microgliale localisée a été observée dans la couche pyramidale de CA3 à partir de 3 jours après injection d'AK, majoritairement dans le hile et l'aire de CA3 et à un moindre degré dans l'aire de CA1. Elle peut être expliquée simplement en raison d'un recrutement microglial en réponse à la mort des cellules moussues du hile et des cellules pyramidales de CA3 de manière plus rapide et plus nombreuse que des cellules pyramidales de CA1. En effet, Bouillieret et al. ont montré une perte cellulaire au niveau du hile survenant dans les 2 à 24 heures qui suivent l'injection d'AK. Cette mort neuronale précoce est expliquée par une haute affinité de l'AK aux récepteurs présents dans des cellules de CA3 et des synapses des fibres moussues au niveau du hile (Ben-Ari & Cossart 2000).

Cependant, l'activation microgliale dans cette zone est-elle simplement une réponse à une mort neuronale ou initie-t-elle également une progression de la maladie ? En effet, l'activation microgliale sécrète différentes cytokines dont l'IL-1 β qui est retrouvée abondamment dans des cerveaux épileptiques (Ravizza *et al.* 2008). L'IL-1 β agit directement sur des cellules endothéliales modifiant la perméabilité de la BHE, permettant ainsi à des leucocytes périphériques de traverser le cerveau et de contribuer à l'épileptogénèse. Cette rupture de la BHE a également expliqué un haut signal TEP TSPO diffus à cette période.

De plus, la phagocytose médiée par les microglies joue également un rôle dans la réorganisation synaptique et la formation du circuit neuronal (Xavier *et al.* 2014). La localisation dans cette étude de microglie activée au sein de la boucle intrahippocampique trisynaptique va dans ce sens. Sa contribution au bourgeonnement aberrant des fibres moussues, qui est un aspect important des crises récurrentes, n'est toujours pas claire.

4.3.1.2. Effets protecteurs des microglies

Dans notre étude, nous avons observé des activations microgliales qui ne sont pas seulement limitées à des couches pyramidales où la mort neuronale est induite par l'injection d'AK mais aussi dans des zones de strata, des zones de projections axonales et dendritiques qui sont riches en connexions synaptiques. Cette distribution a renforcé l'hypothèse que les microglies n'ont pas seulement la capacité d'éliminer des débris cellulaires mais jouent aussi le rôle d'harmonisation de la fonction synaptique en contrôlant le comportement des récepteurs de neurotransmetteurs (Xavier *et al.* 2014).

De plus, dans l'hippocampe controlatéral où la mort neuronale n'est pas observée dans ce modèle, nous avons également une activation astrocytaire et notamment une activation microgliale seulement dans des zones de strata. En effet, l'activation microgliale n'a pas souvent un effet direct sur la modulation de transmission synaptique mais elle va activer des astrocytes modulant la neurotransmission (Pascual *et al.* 2012). Cela explique une activation microgliale et astrocytaire simultanément à cette période. Ainsi, l'activation microgliale via l'activation astrocytaire pourrait moduler le seuillage et l'intensité des activités synaptiques dans le circuit local. Un prélèvement de l'hippocampe controlatéral à ce moment pourrait permettre d'étudier davantage des mécanismes moléculaires au niveau des microglies activées (interleukine, voie de signalisation) pouvant atténuer atténuant les crises.

En résumé, la TEP ciblant la TSPO permet de détecter un fort signal inflammatoire durant la période d'épileptogénèse. Cette information laisse ouverte la possibilité de quantifier le signal inflammatoire au cours de traitement, pour disposer d'un biomarqueur permettant de tester l'efficacité de différentes molécules présentant des propriétés anti inflammatoires ou anti épileptiques. Cependant, nous avons également montré que la neuroinflammation dans cette période n'est pas un phénomène simple car elle présente probablement à la fois une composante protectrice et une

composante destructrice comme toute réaction du système immunitaire.

Ainsi, un traitement anti inflammatoire simple comme minocycline inhibant l'activation microgliale est difficilement envisageable. Il est indispensable de développer des médicaments plus ciblés soit contre des effets néfastes (anti IL-1 β par exemple) soit pour promouvoir des effets potentiellement protecteurs.

4.3.2. Ictogénèse

Cette phase se caractérise par des crises épileptiques spontanées et récurrentes persistant durant toute la vie de la souris. La plupart des stratégies neuroprotectrices sont développées pour agir dans la période d'épileptogénèse pour éviter la formation du cerveau épileptique alors que l'ictogénèse est la période possiblement plus réaliste à cibler en recherche translationnelle, sachant que le diagnostic d'épilepsie n'est généralement confirmé que quand les patients présentent des crises récurrentes : il est ainsi quasiment impossible de sélectionner les patients dans la période sans crise d'épilepsie (épileptogénèse) pour tester l'efficacité de nouveaux traitements.

Nous avons démontré une persistance des cellules gliales qui pourrait être détectées par la TEP ciblant la TSPO dans cette période, ouvrant ainsi une autre fenêtre thérapeutique de l'épilepsie ciblant la neuroinflammation. Nous pouvons séparer cette période en deux phases en fonction du type de cellules gliales prédominant.

4.3.2.1. Phase précoce – rôle de la microglie activée localisée à la couche pyramidale CA1

Durant la période précoce d'ictogénèse (entre 14 jours et 1 mois), le signal TSPO diminue, correspondant à une nette réduction du nombre de microglies activées au niveau du hile. Cependant,

ce signal reste encore élevé principalement du fait de microglies activées résiduelles dans la couche CA1.

En effet, par rapport à des cellules pyramidales de CA3, celles de CA1 sont moins sensibles à l'AK. Ceci explique pourquoi une injection systémique d'AK chez le modèle du rat entraîne une mort neuronale plus importante dans la zone CA3. Dans le modèle de souris induit par une injection intrahippocampique d'AK au niveau de CA1, la mort neuronale survient également précocement dans la zone CA3c/CA4 alors que des cellules de CA1 présentent une forme pycnotique (elles sont endommagées mais possiblement ne sont pas encore mortes).

Les cellules pycnotiques de CA1 jouent-elles un rôle dans la progression de la maladie ? Ainsi, par rapport aux cellules pyramidales CA1 normales, ces cellules fragilisées peuvent être plus sensibles (par rapport aux cellules CA1 normales) aux crises épileptiques qui contribuent à leur disparition définitive. La mort neuronale entraîne alors l'activation microgliale dans la couche CA1 qui, une fois détruite, contribue au recrutement astrocytaire « activé » qui prend le relais de l'excitabilité. Cela conduit ainsi à un circuit épileptique (hile-CA3-CA1) responsable des crises persistantes toute la vie de la souris. Alors que chez le modèle du rat, des cellules CA1 « saines » sont moins sensibles à des crises récurrentes, elles survivent et empêchent la formation du circuit épileptique, de sorte que les crises peuvent disparaître au temps tardif.

En résumé, un traitement anti-crise débutant précocement dans cette phase précoce pourrait empêcher potentiellement la mort neuronale dans la couche CA1 et ainsi diminuer le recrutement microglial.

4.3.2.2. Phase tardive – SH établie avec une astrogliose importante à 6 mois après injection d'AK

Pour la première fois, nous avons démontré un signal TEP ciblant la TSPO élevé dans la SH de la souris épileptique, provenant d'un mélange de différents composants de la cicatrice gliale (astrogliose sévère, accumulation de microglies/macrophages et augmentation de densité vasculaire). Normalement, suite à une agression du parenchyme cérébral comme dans le cas de traumatisme, l'astrocyte activé joue un rôle important dans la construction de la cicatrice pour isoler la lésion du tissu sain. Il a été montré que l'ablation des astrocytes réactifs dans le modèle traumatique du cerveau aggrave les dommages neuronaux (Myer *et al.* 2006).

Cependant, comme la microglie activée, l'activation astrocytaire a un effet néfaste, particulièrement dans la SH. Les astrocytes activés secrètent également des cytokines pro et anti-inflammatoires qui présentent un rôle pro ou anti-convulsant (Wetherington *et al.* 2008). Par exemple, le TNF α sécrété par l'astrocyte activé et aussi par la microglie activée agit sur le récepteur TNFR1 stimulant la sécrétion de glutamate par les astrocytes. De plus, des astrocytes activés perdent également (downregulation) la capacité de sécrétion de synthétase glutamine entraînant une augmentation de concentration glutamine qui va promouvoir des crises épileptiques (Wetherington *et al.* 2008). Récemment, en utilisant des souris transgéniques, Robel *et al.* ont démontré que l'astrogliose réactive perdant des capacités homéostatiques a contribué directement au développement des crises spontanées (Robel *et al.* 2015).

En résumé, la persistance de l'activation gliale dans la SH pourrait ouvrir une autre fenêtre thérapeutique de l'épilepsie ciblant la neuroinflammation qui pourrait être évaluée *in vivo* par imagerie TEP ciblant la TSPO dans ce modèle de souris. La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR, en limitant la prolifération des astrocytes, la migration et la production de médiateurs inflammatoires, pourrait atténuer l'état de mal. L'évaluation de cet inhibiteur dans cette phase

tardive pourrait être une nouvelle piste de traitement antiepileptique.

5. Conclusion

Nous avons démontré la faisabilité de la TEP ciblant la TSPO dans la surveillance longitudinale *in vivo* de la neuroinflammation impliquée dans la constitution de la SH dans le modèle d'épilepsie chez la souris. La TEP a mis en évidence également des signaux élevés au niveau des zones extrahippocampiques. Ces derniers seront discutés en détail dans le chapitre suivant.

L'immunofluorescence a révélé l'évolution de l'activation gliale durant l'épileptogénèse et l'ictogénèse. La persistance du signal inflammatoire dans la SH pourrait ouvrir une nouvelle fenêtre de traitement anti-épileptique ciblant la neuroinflammation.

Chapitre IV. Quantification de l'expression de la protéine TSPO par modélisation de la TEP dynamique au ^{18}F -DPA-714 dans un modèle d'EMT chez la souris

Le pourcentage de dose injectée (%ID/cc) est un paramètre semi-quantitatif, simple et utile pour comparer différents examens, mais qui ne reflète pas une information biologique spécifique. La modélisation cinétique du signal TEP dynamique permet, en théorie, d'estimer des paramètres physiopathologiques plus précis à partir des mesures réalisées sur des acquisitions effectuées à différents temps.

Sa possible mise en œuvre sur les données acquises dans le contexte de nos études longitudinales présentées dans le **chapitre 3** a été étudiée, en étroite collaboration avec le Dr Catriona Wimberley qui a largement participé à l'obtention des résultats figurant dans ce chapitre. Ce chapitre présente les difficultés spécifiques rencontrées pour ces analyses, les méthodes explorées, et les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de ces études.

1. Principe de la modélisation cinétique en TEP et défis en imagerie préclinique

1.1. Définitions générales

La modélisation cinétique en TEP consiste à définir un modèle mathématique qui décrit les mécanismes biologiques sous-jacents aux données TEP dynamiques acquises. Elle permet d'identifier les paramètres du modèle pour déduire des informations physiologiques pertinentes, par exemple, la concentration d'un récepteur dans un volume tissulaire. Cette partie présente la terminologie utilisée en modélisation cinétique par TEP.

Pour faire de la modélisation cinétique en TEP, nous avons d'abord besoin des **contributions (input)**. Il s'agit de courbes temps-activité (TAC) mesurées dans différentes régions et de la fonction d'entrée artérielle.

Courbe temps-activité (TAC). La TEP dynamique permet l'acquisition continue du signal radioactif cérébral pendant un intervalle de temps, sous la forme d'une série d'images. Cette série d'images permet d'extraire des courbes tissulaires de l'activité émise par le radiotraceur dans différentes régions au cours du temps. La concentration radioactive mesurée dans une région d'intérêt (ROI) au cours du temps constitue **la courbe temps-activité (TAC)**.

Fonction d'entrée artérielle (FE). Durant l'acquisition de la TEP, un prélèvement sanguin artériel permet d'obtenir une courbe temporelle de l'activité radioactive dans la circulation artérielle.

Le signal de la TAC mesurée dans une région est la somme du signal tissulaire du radioligand (signal spécifique, non spécifique et libre) et du signal vasculaire (environ 5% de radioactivité totale). L'objectif de la modélisation est d'isoler la part spécifique du reste du signal au niveau local (région d'intérêt), voire au niveau du voxel. Pour ce faire, il existe différents types de modèles que nous décrivons très brièvement.

Modèles compartimentaux. Il s'agit de l'approche la plus rigoureuse et complète, qui nécessite à la fois la TAC et la FE artérielle. Le nombre de compartiment dépend de la biodistribution du radioligand. Ces modèles se formulent mathématiquement par un système d'équations différentielles qui décrit les échanges possibles entre compartiments et qui fait intervenir des constantes d'échange.

Modèle simplifié avec courbe de référence tissulaire (Gunn *et al.* 1997, Lammertsma & Hume 1996). Dans ce cas, la FE est remplacée par une TAC d'une région dite **région de référence**. La région de référence est, par hypothèse, une région dans laquelle la concentration spécifique est négligeable, l'amplitude de la liaison non-spécifique est la même que dans les régions d'intérêts et les échanges entre les compartiments libre et non-spécifique sont rapides.

Méthodes d'analyse graphique. Cette méthode est basée sur une représentation graphique, développée indépendamment des modèles compartimentaux. La méthode la plus utilisée pour des couples radioligand-récepteur réversibles est **la méthode de Logan** (Logan *et al.* 1990). Elle nécessite la TAC de la région d'intérêt et celle de la fonction d'entrée artérielle. Cette dernière pourrait être également remplacée par la **région de référence** donnant le nom de la méthode Logan de référence.

La modélisation résulte en des **sorties (output)** qui correspondent aux paramètres physiologiques, et notamment le volume de distribution et le potentiel de liaison.

Le **volume de distribution (V_T)** est le ratio à l'équilibre entre la concentration de radioligand (spécifique, non spécifique et libre) dans le tissu et celle du plasma.

Le **potentiel de liaison (BP)** est le ratio à l'équilibre entre la concentration de radioligand spécifiquement lié dans le tissu étudié et celle dans la région de référence. En fonction du choix de la région de référence, trois types de BP sont distingués :

- **BP_F** correspondant à celle du radioligand libre dans le plasma ;
- **BP_P** correspondant à celle du radioligand total dans le plasma ;
- **BP_{ND}** correspondant à celle du radioligand non-déplaçable dans le tissu.

Ce **BP_{ND}** est la mesure typique utilisée à partir d'un modèle simplifié avec référence tissulaire.

Dans le cerveau, la protéine TSPO est retrouvée initialement dans des cellules gliales (voir la **partie 4.1** du **chapitre I**). Après administration intraveineuse de radioligand, des ligands libres traversant la BHE se fixent sur les protéines TSPO de manière réversible. Ainsi, nous avons utilisé dans un premier temps le modèle simplifié à deux compartiments : le compartiment spécifique de la TSPO et le compartiment de référence comprenant des radioligands non-déplaçables (non spécifique et libre) pour déduire le BP_{ND} . Actuellement, il n'existe pas de vraie région de référence en raison de liaison vasculaire à la TSPO, ainsi, des régions utilisées dans notre étude (striatum ou pont du tronc cérébral) s'appellent pseudo-région de référence.

Cependant, comme expliqué dans la **partie 5.1** du **chapitre I**, la découverte de l'expression de TSPO par des cellules endothéliales rend impossible la définition d'une vraie région de référence. Ainsi, actuellement, nous ne pouvons que calculer le V_T à partir de la fonction d'entrée dérivée de l'imagerie TEP en utilisant la méthode de Logan comme présenté dans le reste de ce chapitre.

De plus, chez la souris, la modélisation cinétique est tout particulièrement complexe pour deux raisons. Premièrement, **l'effet du volume partiel** induit par la petite taille des structures dans le cerveau de la souris comparée à la résolution spatiale de microTEP biaise les mesures de concentration de traceurs dans les petites structures, et la correction de volume partiel est compliquée par le rapport signal-sur-bruit limité dans les données TEP dynamiques. Deuxièmement, l'expression de TSPO pouvant exister dans toutes les régions cérébrales, il n'est pas très rigoureux d'utiliser une région de référence pour la quantification, et il est donc nécessaire de mesurer une fonction d'entrée artérielle, ou à défaut veineuse, ce qui est un réel défi chez la souris.

1.2. Effet de volume partiel (EVP)

L'effet du volume partiel fait référence à deux phénomènes distincts qui conduisent le plus souvent à une sous-estimation de l'intensité des voxels mesurée dans l'image par rapport à leur valeur réelle.

Le premier effet est dû à l'échantillonnage des images (ou tissue fraction effect en anglais), qui fait que les valeurs mesurées sont les valeurs moyennes des valeurs d'activité réellement présentes dans les régions sous-jacentes, et donc que les valeurs mesurées dépendent de la taille des voxels (**figure IV-1-1**).

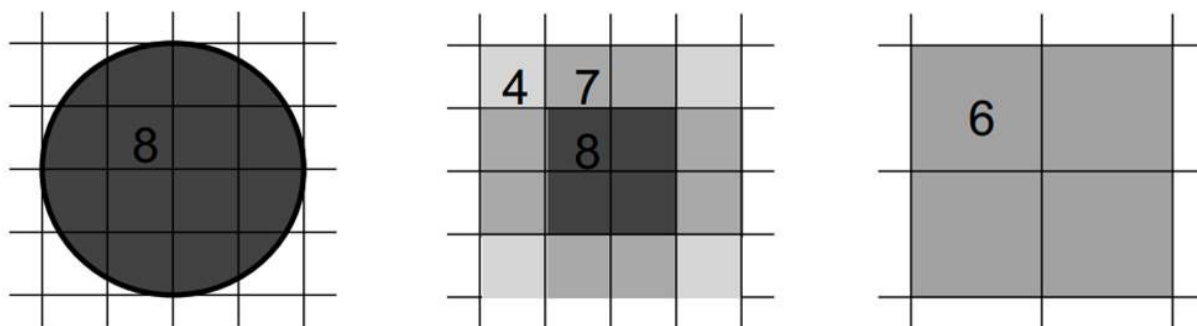


Figure IV-1-1. Illustration de l'échantillonnage des images (cours d'I. Buvat, 2016). Les pixels de petites tailles au centre de la structure d'intérêt ne sont pas affectés par l'EVP (valeur = 8), alors que les valeurs des pixels de tailles plus grandes sont sous-estimées car la valeur mesurée est la moyenne des valeurs des tissus sous-jacents (valeur = 6).

Le deuxième effet est dû à la résolution spatiale limitée en TEP : l'activité dans une structure d'intérêt de signal élevé est sous-estimée tandis que l'activité dans les structures voisines présentant un plus faible signal peut « contaminer » la structure d'intérêt (**figure IV-1-2**).

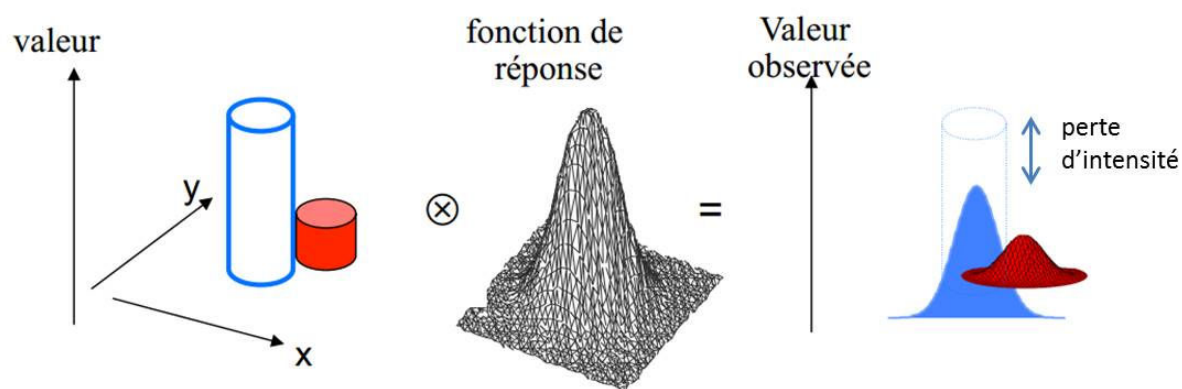


Figure IV-1-2. Illustration de l'EVP liée à la résolution limitée en TEP (cours d'I. Buvat, 2016).

La fonction de réponse est une fonction mathématique décrivant la réponse d'un système d'imagerie à une source ponctuelle et caractérise la résolution spatiale du système, donnée par la largeur à mi-hauteur de cette fonction de réponse (LMH). De façon générale, l'EVP lié à la résolution spatiale limitée du détecteur entraîne une sous-estimation du signal maximum mesuré dans la structure d'intérêt si la taille de cette structure est inférieure à environ 3 fois de la LMH du système.

La résolution spatiale de l'Inveon microTEP-CT est environ 1,5 mm (Constantinescu & Mukherjee 2009) au centre du champ de vue tandis que le grand axe de l'hippocampe dorsal est d'environ 2,5 mm (mesuré sur des images d'immunohistologie en DAPI) : les mesures sont donc affectées par l'EVP.

Il existe de nombreuses méthodes de correction de l'EVP (Erlandsson *et al.* 2012) mais il n'existe pas de consensus quant à la meilleure méthode à utiliser. Nous avons évalué la méthode de **déconvolution itérative combinée avec une régularisation spectrale (ID-SR)** développée par (Reilhac *et al.* 2015), compte tenu des performances très encourageantes rapportées dans la littérature pour cette méthode.

Cette méthode suppose que l'image observée résulte du produit de convolution de la distribution d'activité réelle par la fonction de réponse du système d'imagerie (**Figure IV-1-2**). L'image originale est restaurée en inversant ce produit, c'est à dire en effectuant une opération dite de **déconvolution par une méthode itérative** (pour distinguer avec une méthode analytique).

La déconvolution a la particularité de ne pas nécessiter d'image anatomique ou d'hypothèse géométrique concernant les structures avoisinantes. Cependant, cette méthode entraîne également une amplification du bruit dans l'image déconvoluée : une **régularisation** est donc nécessaire pour limiter cette amplification du bruit. Des méthodes avancées de filtrage d'images 4D (espace 3D + temps) peuvent être utilisées pour débruiter les images déconvoluées.

1.3. Fonction d'entrée (FE)

La fonction d'entrée (FE) est une courbe représentant la concentration d'activité des radioligands dans le plasma en fonction du temps, obtenue à partir de prélèvements sanguins artériels qui doivent être réalisés durant l'acquisition TEP. Elle est nécessaire pour l'identification des paramètres des modèles compartimentaux, et dans les cas où la région de référence n'existe pas.

Cependant, l'obtention de la FE est toujours compliquée chez la souris. Premièrement, le volume sanguin de la souris est petit, environ 1,8 ml pour une souris de 25g. La recommandation concernant le volume maximal que l'on peut prélever est à 0,2 ml (10%) une fois par jour (Diehl *et al.* 2001) alors que la fonction d'entrée nécessite un prélèvement sanguin à différents moments pendant l'acquisition. En outre, la mesure précise de l'activité volumique dans un volume si petit est complexe. Le prélèvement d'un volume plus grand, qui serait mieux adapté à l'estimation de la concentration d'activité, met en danger la vie de l'animal pendant l'acquisition de 60 min.

Deuxièmement, le positionnement d'un cathéter dans l'artère fémorale de la souris est un geste très technique que nous ne maîtrisons pas suffisamment.

Une alternative à la mesure expérimentale de fonction d'entrée artérielle par prélèvement est son estimation à partir des images, en mesurant la TAC extraite de l'artère abdominale à partir des images TEP-IRM (Evans *et al.* 2015), ou en l'estimant par une méthode d'**analyse factorielle (AF)**.

L'AF des séquences d'images dynamiques est une méthode qui résume le contenu d'une séquence d'images indexées par le temps en un petit nombre d'images, dites images factorielles, et de courbes associées, appelées **facteurs**. Chaque image factorielle correspond à une composante, représentant un compartiment physiologique, dans lequel le signal change d'une manière caractéristique au cours du temps décrite par le facteur associé qui représente l'évolution du signal au cours du temps dans le compartiment (**figure IV-1-3**).

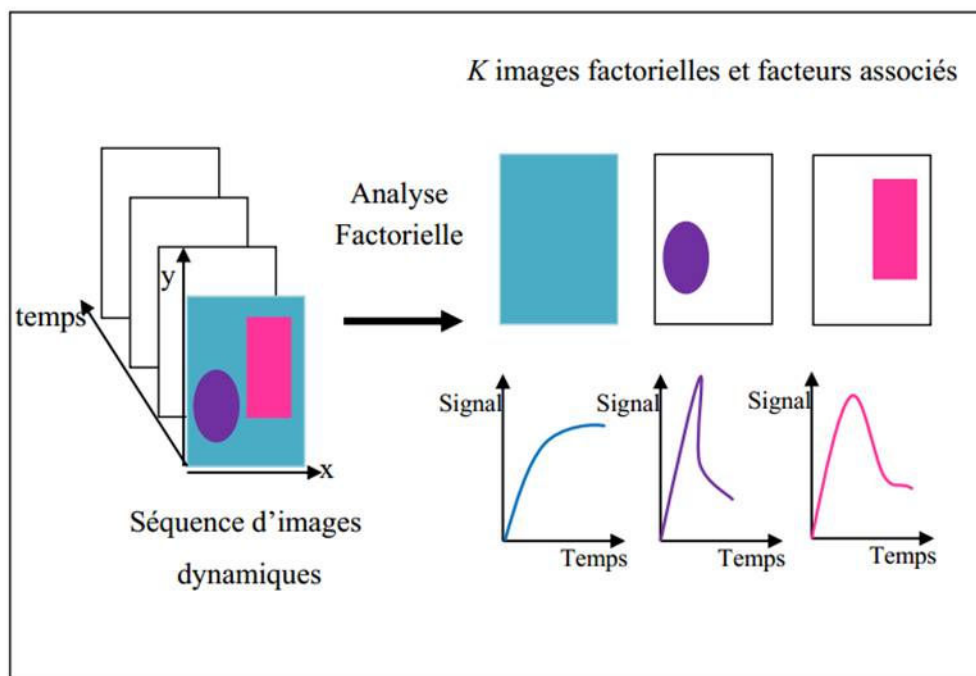


Figure IV-1-3. Représentation synthétique du contenu d'une séquence d'image par l'AF (cours d'I. Buvat, 2016).

En appliquant l'AF sur une séquence d'images TEP dynamiques incluant le thorax et l'abdomen de la souris, nous pouvons espérer extraire automatiquement une image factorielle des grosses artères dont le facteur associé fournirait une courbe estimant la fonction d'entrée artérielle.

En résumé, la modélisation cinétique permet d'extraire des informations quantitatives plus précises de séries d'images TEP dynamiques. En imagerie préclinique, l'EVP, le bruit et la mesure de FE sont des problèmes sévères qui compliquent l'étape de modélisation cinétique des données. L'objectif de ce chapitre est donc de présenter des tentatives de quantification améliorée par rapport à celle réalisée à partir d'exams présentée au chapitre 3 en utilisant les méthodes de correction d'EVP, débruitage et estimation de la FE maîtrisées dans le laboratoire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

Le traitement d'image a été réalisé sur le groupe de souris AK dans l'étude longitudinale présentée dans **le chapitre 3, figure III-2-1**. Nous avons analysé ici les images à certains points critiques : état basal (n=7), 7 jours (n=5) (où le signal était diffus dans l'ensemble du cerveau), 1 mois (n=6) (où le signal était localisé au niveau de la SH) et 6 mois (n=4) (où la SH était bien établie).

L'étude de pré-saturation a été réalisée chez trois souris de l'état basal par injection de 1mg/kg de DPA-714 froid 5 minutes avant de démarrer le protocole d'acquisition d'imagerie au ^{18}F -DPA-714 (**partie 2.1 du chapitre 2**). Le but de cette étude est pour obtenir la TAC du compartiment sanguin sans TSPO liée aux cellules endothéliales.

2.2. Traitement d'image

Déconvolution itérative combinée avec une régularisation spectrale (ID-SR). Les images reconstruites par OSEM 2D dites **images originales** (4 itérations, 16 sous-ensembles) (voir **partie 2.1.4** du **chapitre 2**) ont été traitées par déconvolution itérative (15 itérations) combinée à une régularisation temporelle (12 fonctions de base temporelles) pour corriger l'EVP sans amplifier excessivement le bruit. Ces paramètres ont été choisis à partir des résultats de simulations réalisées pour déterminer le meilleur compromis entre le biais et le bruit dans les images déconvoluées (Wimberley *et al.* 2014).

Le processus de régularisation nécessite une FE pour créer les 12 fonctions de base temporelles. La forme de cette FE a été obtenue à partir d'une étude de ^{18}F -DPA-714 chez l'homme (Wimberley *et al.* 2017). Cependant, l'amplitude de la FE et la largeur du pic ont été adaptées en utilisant la TAC moyenne manuellement extraite de l'artère abdominale des souris de pré-saturation.

Analyse factorielle. L'AF a été appliquée à chaque série d'images TEP originale (avant de correction de l'EVP et de débruitage) (logiciel PIXIES, <http://www.apteryx.fr/>). Une FE de référence a été créée à partir des souris de pré-saturation en utilisant l'AF avec uniquement la contrainte de positivité sur les facteurs et les images factorielles, et une contrainte de maximum unique dans le facteur correspondant à la FE. L'AF a été ensuite réalisée en utilisant 4 composantes principales et 4 facteurs ont été identifiés en utilisant deux types de contraintes : la forme d'un facteur devrait être similaire à la FE de référence obtenue comme décrit à la phrase précédente et tous les facteurs devaient comporter uniquement des valeurs positives ou nulles.

Les facteurs extraits ont été convertis en concentration radioactive (Bq/cc) en normalisant la somme des facteurs de sorte qu'elle soit égale à l'activité totale extraite de l'image entière pendant

toute la durée d'acquisition. Le facteur similaire au compartiment sanguin a été pris et utilisé comme la **fonction d'entrée dérivée de l'image TEP (FEDI)**.

Atlas IRM. Dans ce chapitre, des images du cerveau TEP reconstruites ont été manuellement recalées à l'atlas de Dorr (Dorr *et al.* 2008) à l'aide des contours du CT en utilisant le logiciel Anatomist. Contrairement à l'atlas utilisé dans Pmod (simple à utiliser, chapitre 3), cet atlas IRM a l'avantage de permettre la définition de sous-régions d'intérêt, ce qui est particulièrement utile pour analyser le cortex dans lequel différentes zones nécessitent d'être distinguées en épilepsie.

2.3. Analyse des données

Pour étudier **l'impact de l'atlas sur la quantification** au niveau des hippocampes, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Pearson entre le %ID/cc estimé par l'atlas de Mirrione (atlas Pmod, atlas 1) et l'atlas de Dorr (atlas 2) de l'ensemble des examens aux différents moments présentés dans la **partie 2.1** du même chapitre.

Pour étudier **l'impact du traitement d'image ID-SR**, nous avons utilisé le modèle simplifié (SRTM2) avec courbe de référence extraite de la moyenne des striata droit et gauche pour estimer le BP_{ND} de chaque région d'intérêt (Wu & Carson 2002). La TAC est extraite des images originales et des images déconvoluées.

L'analyse n'a été réalisée que sur des souris à l'état basal et à 1 mois après d'injection d'AK où le signal dans le striatum était faible et stable, pour être dans des conditions proches des hypothèses sous-jacentes à l'utilisation d'une pseudo-région de référence.

La différence de BP_{ND} entre l'état basal et l'examen à 1 mois a été calculée pour chaque souris. Un t-test apparié a été réalisé pour chaque région d'intérêt pour déterminer la significativité

de la différence de BP_{ND} entre ces deux moments.

Pour étudier **la précision et la robustesse de la méthode d'extraction de la FEDI**, la représentation graphique de Logan a été utilisée, à la fois avec la FEDI extraite de l'AF pour estimer le volume de distribution total (V_T), et avec la courbe de référence extraite du pont du tronc cérébral pour estimer le BP_{ND} . L'analyse n'a été également réalisée que sur des souris à l'état basal et à 1 mois après d'injection d'AK où le signal dans le pont était plus faible et plus stable que celui des striata, pour se rapprocher des conditions vérifiant les hypothèses de la méthode de pseudo-région de référence.

Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé entre BP_{ND} et V_T de toutes les régions et toutes les souris à l'état basal et aussi à 1 mois, conduisant à 2 coefficients de corrélation.

Le coefficient de variation multiplié par 100 ($\text{écart-type} \times 100 / \text{moyenne}$) des BP_{ND} et des V_T a été calculé pour chaque région pour les 2 temps. La moyenne de ce coefficient de variation sur l'ensemble des régions et tous de tous les temps a été calculée pour évaluer la variabilité de chaque méthode. La variabilité de la hauteur du pic de la FEDI estimée par AF et par la ROI manuellement tracée a été évaluée de même manière.

Pour étudier **l'évolution longitudinale de l'expression de la protéine TSPO**, nous avons estimé le V_T par la méthode de l'extraction de FEDI (décrite ci-dessus) de chaque région d'intérêt de l'atlas Dorr à chaque moment : état basal, 7 jours, 1 mois et 6 mois. Un t-test apparié a été réalisé pour chaque région d'intérêt pour déterminer la significativité de la différence de V_T entre chaque moment après injection d'AK et l'état basal.

3. Résultats et discussion

3.1. Impact de l'atlas sur la quantification

La **figure IV-3-1** montre une bonne corrélation entre deux atlas (R^2 entre 0,91 à 0,95) témoignant la possibilité d'utilisation interchangeable de deux atlas pour la quantification au niveau des hippocampes, sans changer l'allure de l'évolution du signal au niveau des hippocampes.

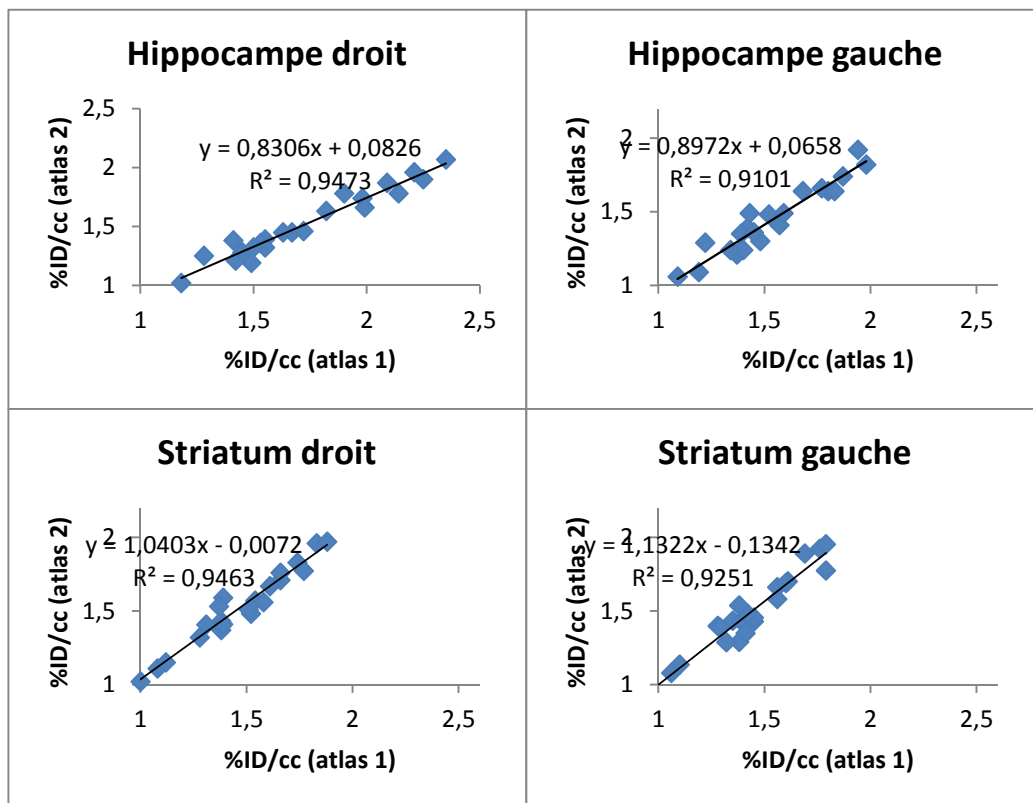


Figure IV-3-1. Corrélation des mesures de %ID/cc entre atlas 1 (atlas de Mirrione) et atlas 2 (atlas de Dorr) au niveau de l'hippocampe et du striatum ($n = 22$ pour toutes les souris et tous les temps).

Cependant, il faut noter que les valeurs mesurées à partir de l'atlas 2 sont globalement plus faibles que celles mesurées à partir de l'atlas 1 au niveau des hippocampes alors que c'est l'inverse au niveau du striatum. Comme le volume de la région des hippocampes et du striatum est similaire entre deux atlas (environ 10 mm³ pour l'hippocampe et aussi pour le striatum), ce biais est possiblement lié au positionnement de l'atlas. En effet, l'hippocampe et le striatum sont deux structures voisines dans les coupes coronales. En fonction du positionnement de l'atlas, la région de l'hippocampe peut inclure une partie du signal du striatum et vice versa comme présentée dans la **figure IV-3-2**.

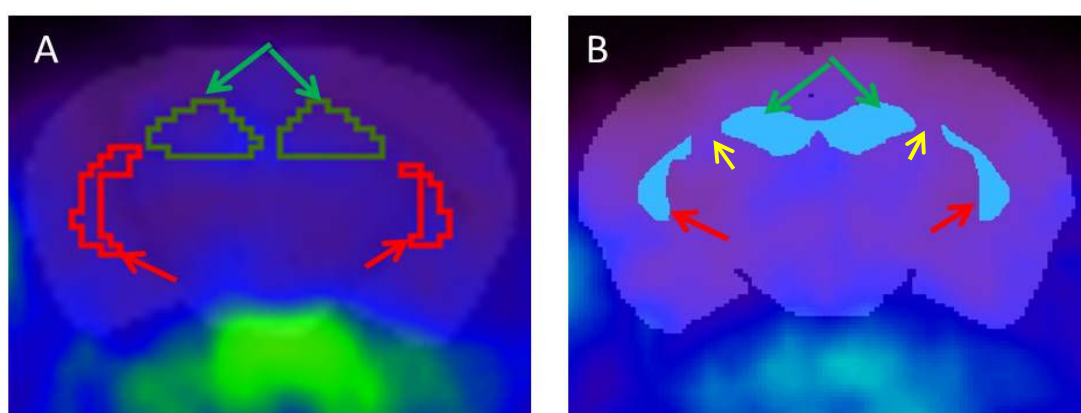


Figure IV-3-2. Continuité de la région des hippocampes (flèches vertes) et des striata (flèches rouges) dans la direction coronale de l'atlas de Mirrione (A) et de Dorr (B). Des signaux des hippocampes estimés par l'atlas de Dorr pourraient être moins contaminés par des signaux ventriculaires (flèches jaunes) que dans le cas de l'utilisation de l'atlas de Mirrione.

La **figure IV-3-3A** montre également un signal élevé dans l'amygdale, le thalamus et le cervelet seulement à 7 jours après injection d'AK concordant avec le résultat retrouvé sur l'atlas de Mirrione (**figure IV-3-3B**).

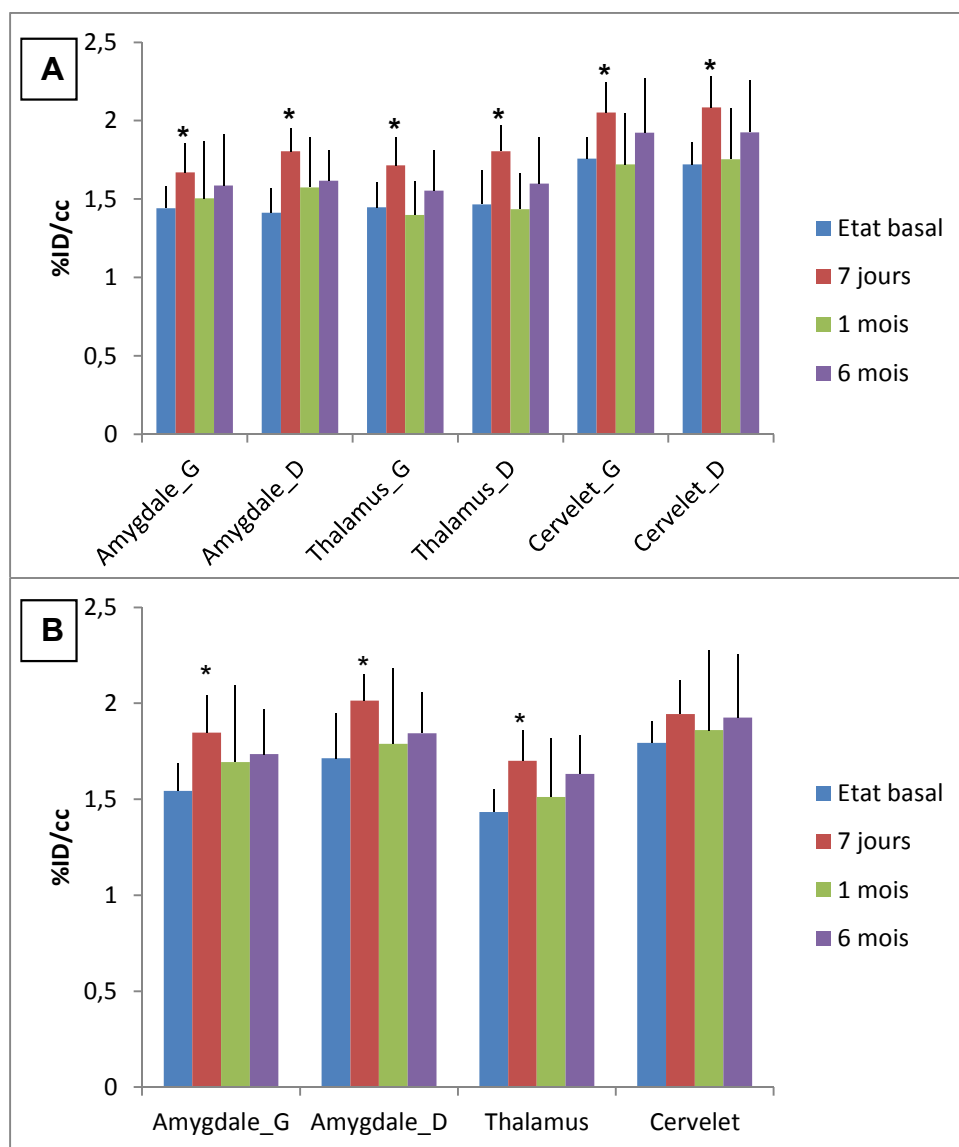


Figure IV-3-3. Evolution de la fixation de ^{18}F -DPA-714 (%ID/cc) dans l'amygdale, le thalamus et le cervelet sur l'atlas de Dorr (A) et sur l'atlas de Mirrione (B). * correspond à la différence significative entre chaque moment après injection d'AK et à l'état basal (t-test apparié).

Comme expliqué dans la **partie 2.1.5 du chapitre II**, nous avons utilisé dans un premier temps l'atlas de Mirrione implémenté dans le logiciel Pmod parce qu'il était déjà publié dans certaines d'études, simple et facile à utiliser. Cependant, le nombre limité de régions d'intérêt, et notamment l'impossibilité de diviser certaines régions du cortex, rendent l'atlas de Dorr actuellement préférable dans le contexte de l'épilepsie.

La **figure IV-3-4** montre ainsi des signaux élevés dans différentes régions corticales que nous ne pouvons pas isoler quand on utilise l’atlas de Mirrione. Cette figure suggère des tendances possiblement variables dans les sous-régions corticales qu’il est pertinent de pouvoir analyser.

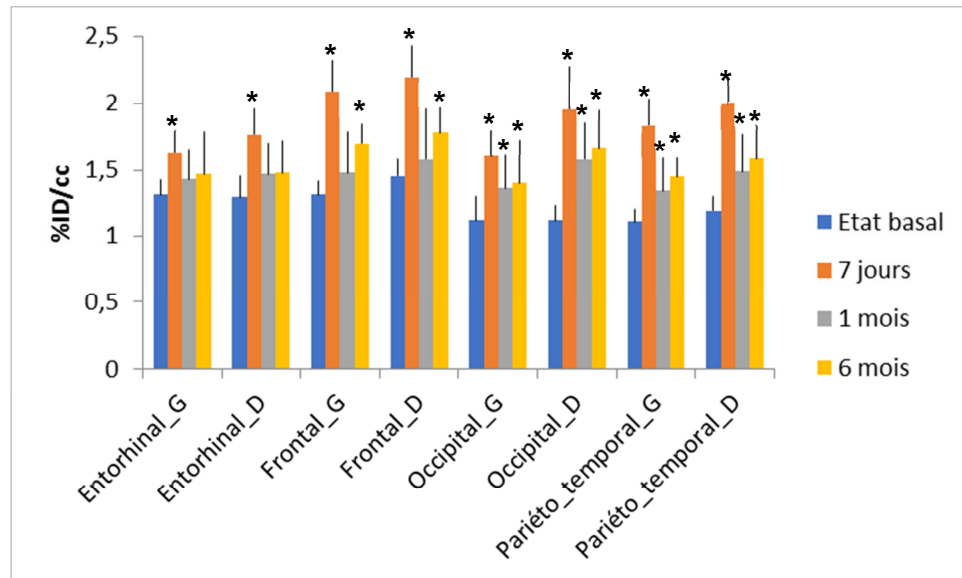


Figure IV-3-4. Evolution de la fixation de ^{18}F -DPA-714 (%ID/cc) dans différentes régions corticales sur l’atlas de Dorr. * correspond à la différence significative ($p < 0.05$) entre chaque moment après injection d’AK et l’état basal (t-test apparié).

A 7 jours après injection d’AK, le %ID/cc est élevé dans l’ensemble des régions corticales, ce qui est concordant avec le signal élevé observé dans le cortex avec l’atlas Mirrione (**figure III-3-3C**). Au contraire, à 1 mois et à 6 mois, un signal élevé est encore détecté dans certaines régions du cortex de l’atlas de Dorr. Ce signal élevé était possiblement mélangé à des signaux plus faibles dans la grande région du cortex de l’atlas de Mirrione, expliquant qu’il soit passé inaperçu avec ce atlas de Mirrione.

En résumé, l'atlas de Mirrione est simple à utiliser dans Pmod par des biologistes et médecins, et interchangeable avec l'atlas de Dorr pour la quantification au niveau des hippocampes. Ce dernier est plus complexe à gérer en raison de nombreuses régions différentes mais il est plus adapté pour étudier des régions extrahippocampiques.

Impact du traitement d'image ID-SR sur la modélisation cinétique du signal TEP chez la souris

L'impact du traitement ID-SR est clairement visualisable sur la **Figure IV-3-5**, en terme de qualité d'images.

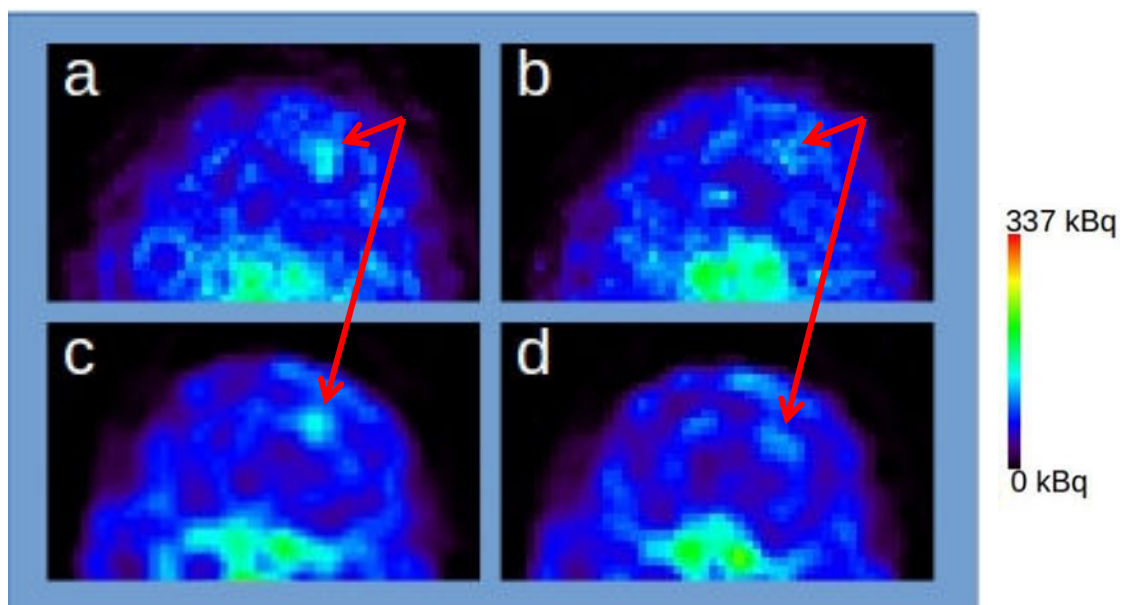


Figure IV-3-5. Images cérébrales du plan coronal de la TEP ^{18}F -DPA-714 (55-60 minutes) chez une souris AK 1 mois après injection, avant (a et b) et après (c et d) traitement ID-SR. Les images après traitement sont moins bruitées et les lésions sont plus faciles à distinguer (flèches rouges), sans que l'on observe une dégradation sensible de la résolution spatiale.

L'impact de ID-SR sur la quantification est montré sur la **figure IV-3-6** qui affiche la différence de BP_{ND} dans chaque région d'intérêt entre l'état basal et AK 1 mois après injection.

Avant ID-SR, le graphique en haut (a) montre que la différence est la plus élevée dans le cortex occipital gauche, et la seule région où la différence est significative est le cortex occipital droit ($p = 0,033$) malgré la lésion induite dans l'hippocampe droit.

Après ID-SR, le graphique en bas (b) montre que la différence de BP_{ND} est la plus élevée dans les hippocampes ($0,28 \pm 0,30$ à gauche et $0,58 \pm 0,61$ à droite), prédominante du côté injecté et est statistiquement significative ($p=0,034$ à gauche et $0,034$ à droite). Une différence significative est également trouvée dans la région pariéto-temporale droite, située au-dessus de l'hippocampe droit ($p=0,006$). La différence dans le cortex occipital droit est également élevée mais n'est pas significative ($p=0,1$).

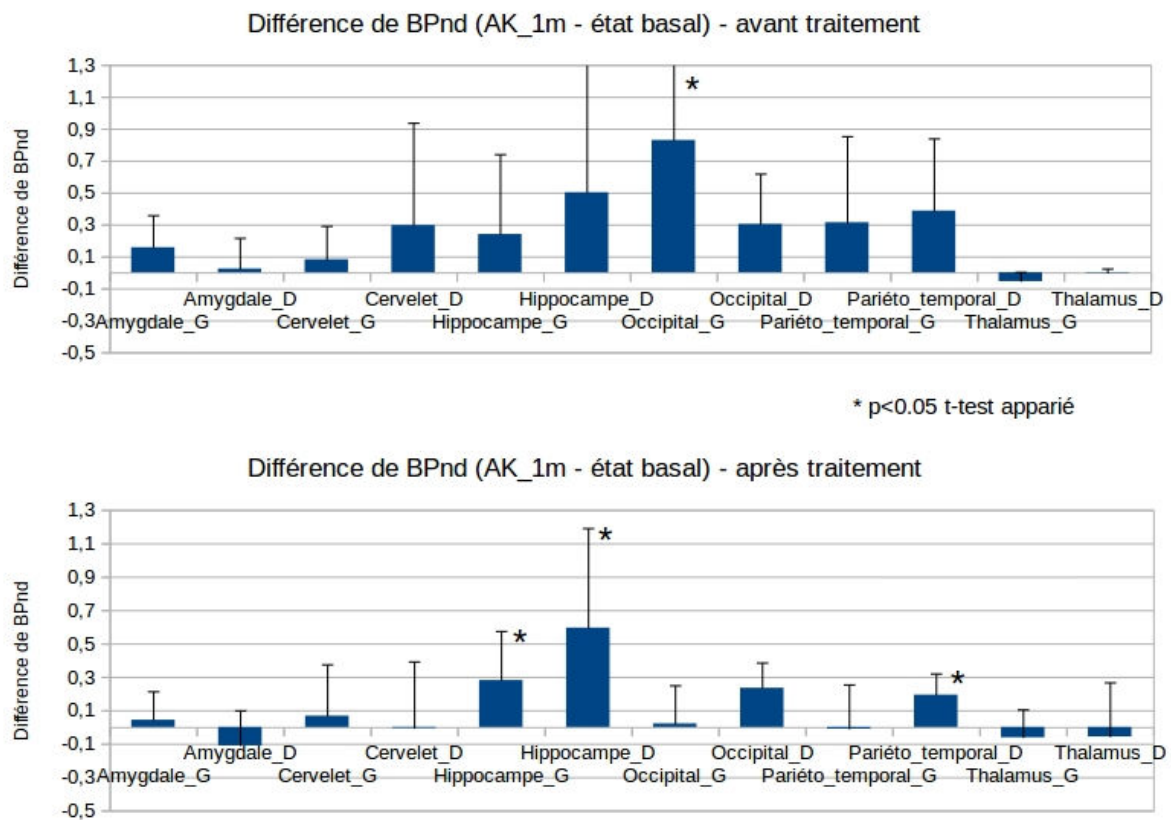


Figure IV-3-6. Moyenne des différences de BP_{ND} entre l'état basal et à 1 mois dans différentes régions d'intérêt chez les souris AK.

Ces différences de BP_{ND} après ID-SR sont attendues dans des régions où un signal élevé a été observé sur l'autoradiographie *in vitro* au ^{18}F -DPA-714 (**chapitre 3, figure III-3-6**). Au contraire, avant ID-SR, la différence est élevée dans des régions inattendues, notamment dans le cortex occipital gauche alors qu'aucune différence significative n'a été trouvée au niveau des hippocampes, suggérant un faux positif.

Ces résultats montrent l'impact remarquable du traitement sophistiqué des images produites par l'imageur pour la modélisation cinétique TEP dans le cerveau de la souris. La correction de l'EVP et le débruitage des images permettent de mettre en évidence des effets qui n'apparaissent pas sans ce post-traitement, et de réduire les régions correspondant à du signal faussement positif à cause du bruit.

Cependant, l'utilisation d'une zone de référence dans le striatum pose deux problèmes. Premièrement, l'expression de la TSPO par des cellules endothéliales est omniprésente même à l'état basal dans le cerveau sain, et ce même au niveau du striatum (**Figure IV-3-7**) ou du cervelet (**Figure IV-3-8**) peu ou pas affectés par la pathologie épileptique.

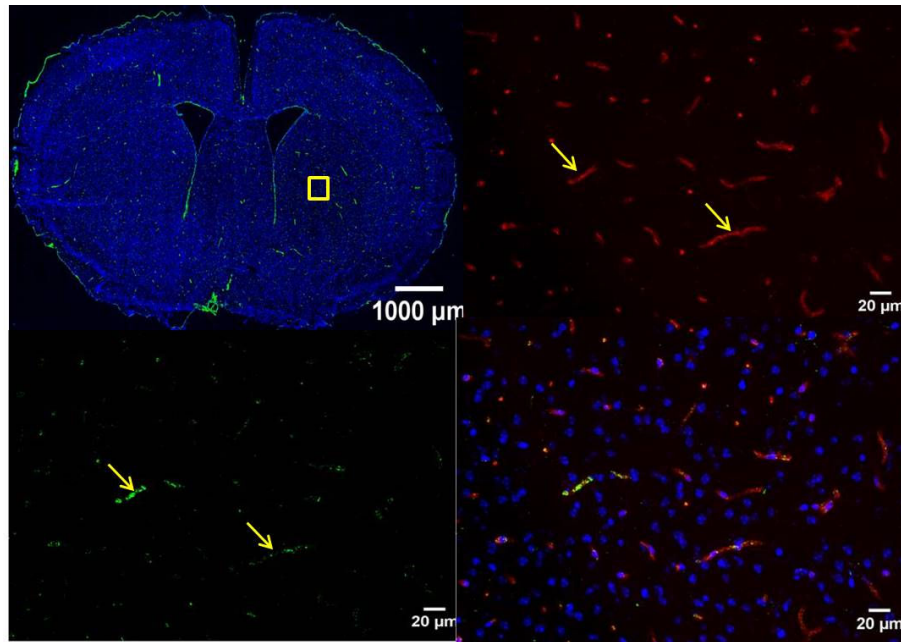


Figure IV-3-7. Image d'immunohistologie de TSPO/CD31 au niveau du striatum (en haut) à l'état basal. Les images en bas correspondent au niveau du carré jaune. Des flèches jaunes montrent une bonne colocalisation entre TSPO et cellules endothéliales. CD31 (rouge), TSPO (vert) et DAPI (bleu).

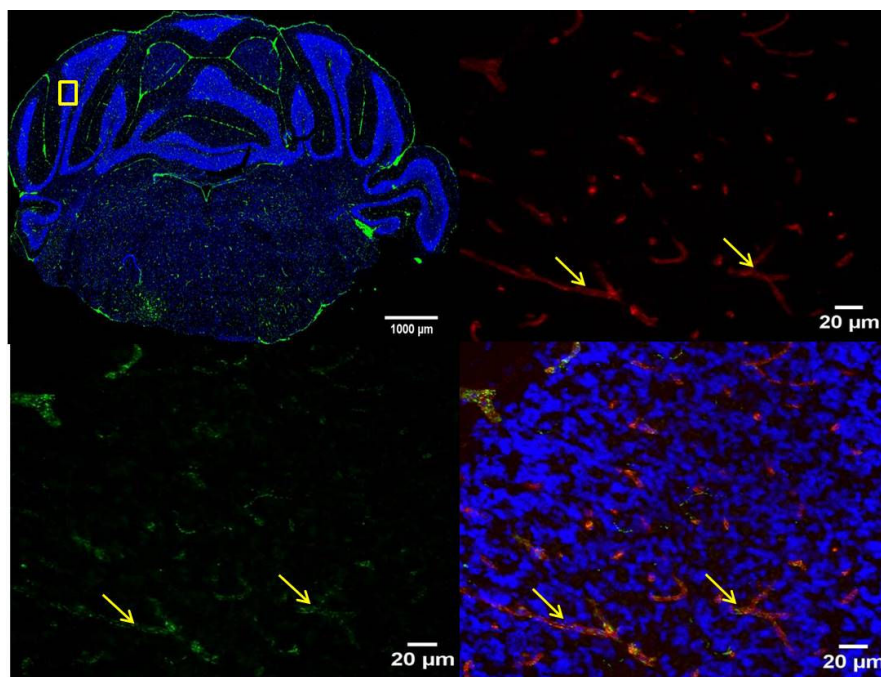


Figure IV-3-8. Image d'immunohistologie de TSPO/CD31 au niveau du cervelet (en haut) à l'état basal. Les images en bas correspondent au niveau du carré jaune. Des flèches jaunes montrent

une bonne colocalisation entre TSPO et cellules endothéliales, même dans la matière grise du cervelet. CD31 (rouge), TSPO (vert) et DAPI (bleu).

Deuxièmement, le signal TEP est également élevé au niveau du striatum et du cervelet à 3 jours et 7 jours après injection d'AK (**chapitre 3, figure III-3-3C**). Ces signaux élevés pourraient être dus à une contamination par un signal très élevé dans les hippocampes aux temps précoces ou être liés à une augmentation de la perfusion globale après injection d'AK.

Il est donc intéressant d'étudier une autre méthode pour la modélisation de la TEP TSPO qui permettrait de s'affranchir de la définition d'une région de référence, par exemple une modélisation utilisant la fonction d'entrée dérivée des images TEP par analyse factorielle.

3.2. Précision et robustesse de la méthode de l'extraction de FEDI

La **figure IV-3-9** décrit les 4 facteurs extraits à partir de la série d'images TEP dynamiques. L'image en haut montre des coupes coronales de l'abdomen chez la même souris avec les 4 facteurs associés en bas.

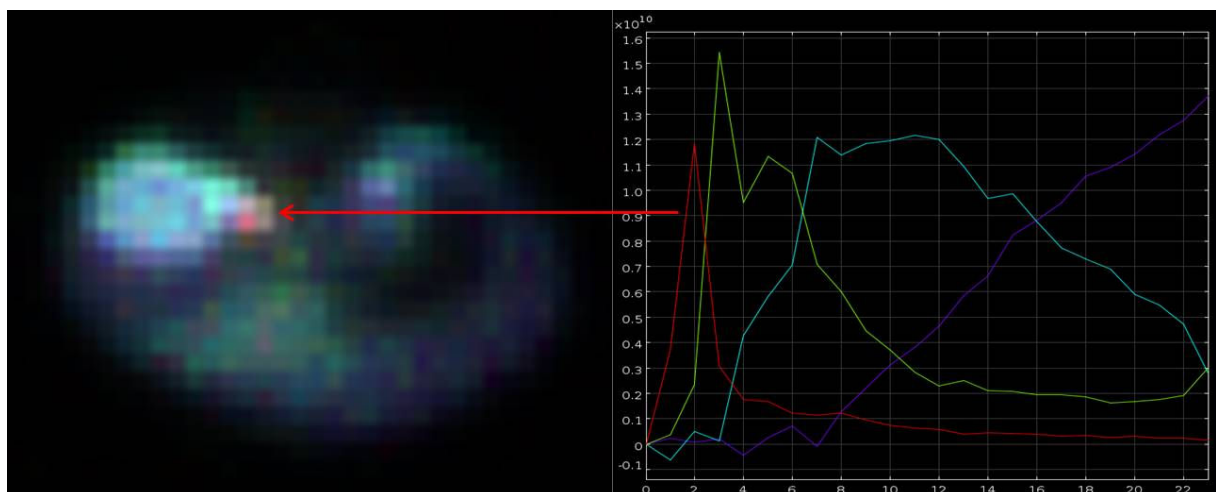


Figure IV-3-9. Représentation quadrichrome des résultats de l'analyse factorielle avec 4 facteurs représentée par de différentes couleurs au niveau des reins et de l'artère abdominale. La

courbe rouge représente le compartiment sanguin localisé en rouge dans la coupe (flèche rouge).

La **figure IV-3-10** montre la moyenne des facteurs normalisés en %ID pour le compartiment sanguin sur tous les scans. La hauteur du pic des facteurs extraits associés au compartiment sanguin montrent une forte corrélation avec des doses injectées ($r^2 = 0,90$). Comparée à la FEDI extraite de la ROI manuellement dessinée au niveau de l'artère abdominale, celle estimée par AF estime mieux le pic de la FE : le coefficient de variation de la hauteur du pic de la FE valait 9% pour la FE estimée par AF et 33% avec le tracé manuel. La forte variabilité observée avec la méthode manuelle est due à la petite taille de l'artère abdominale (**figure IV-3-9**) qui ne permet pas de positionner la ROI de manière reproductible sans image anatomique comme l'IRM. L'avantage de l'AF réside également dans le fait que nous pouvons enlever le signal endothélial basé sur des contraintes citées au-dessus. Ceci explique pourquoi le signal de la FEDI à 60 minutes est plus bas par méthode d'AF que par méthode manuelle.

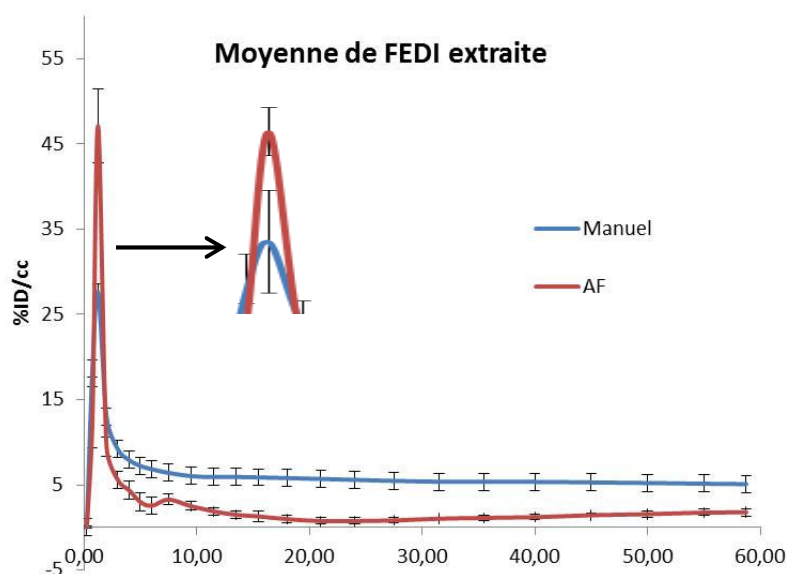


Figure IV-3-10. FEDI moyenne extraite (%ID/cc) par tracé manuel au niveau de l'artère abdominale (bleu) et par AF (rouge) à partir de tous les scans avec un écart-type. La flèche noire montre une variabilité plus élevée de la hauteur du pic de la FEDI estimée par AF que par tracé manuel.

La **figure IV-3-11** montre des corrélations régionales des paramètres de liaison pour l'ensemble des souris à deux moments. Ces corrélations sont élevées à la fois à l'état basal (A), avec une corrélation de $r^2 = 0,99$ et à 1 mois après d'injection d'AK (B) avec une corrélation de $r^2 = 0,99$.

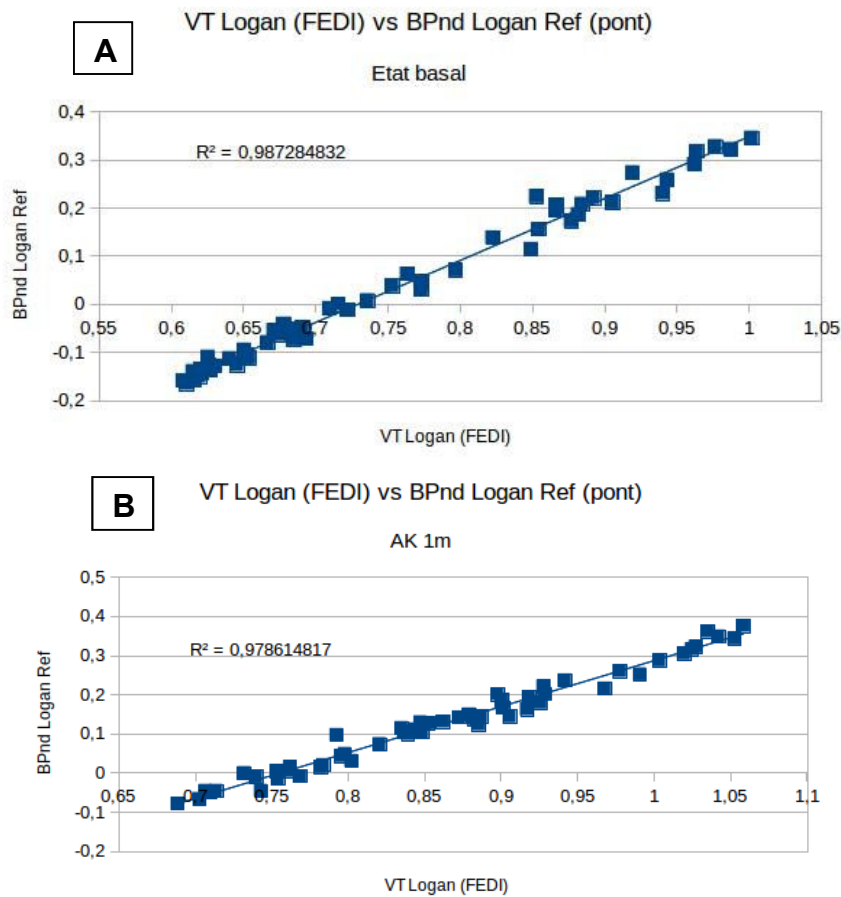


Figure IV-3-11. Corrélations régionales entre le V_T estimé à partir de la représentation graphique de Logan en utilisant l'FEDI versus le BP_{ND} estimé à partir de la représentation graphique de Logan avec la courbe de référence extraite du striatum. En haut, l'analyse a été réalisée à l'état basal et en bas à 1 mois après injection d'AK.

Les paramètres de liaison obtenus en utilisant l'FEDI extraite avec l'AF sont très corrélés à ceux estimés en utilisant une région de référence, dans le cas où l'on peut supposer que la région de référence est quasiment dénuée de fixation spécifique.

La moyenne de coefficient de variation de l'ensemble des mesures de V_t est égal à 15% alors celle des mesures de BP_{ND} estimées à partir de la région de référence vaut 143%. Cela démontre que l'estimation de V_t à partir de l'FEDI est moins variable que l'usage de la région de référence.

Ces résultats préliminaires sont des premiers éléments de validation de l'approche qui pourrait ainsi être utilisée lorsqu'il n'existe pas de région de référence disponible.

3.3. Quantification de l'expression de la TSPO (V_t) durant l'étude longitudinale en utilisant la méthode de l'extraction de FEDI

La **figure IV-3-12** suggère que le V_t est un paramètre plus fiable que le %ID. En effet, au niveau de l'hippocampe droit (hippocampe injecté), le V_t à 1 mois est plus élevé que celui à 6 mois alors que le %ID/cc n'est pas différent entre ces 2 moments. La différence de V_t entre 1 mois et 6 mois est plus concordante avec les résultats d'autoradiographie que l'absence de différence observée avec le %ID/cc (**figure III-3-8**). Le signal élevé à 1 mois correspond à une persistance résiduelle des microglies activées au niveau de la couche CA1 alors qu'à 6 mois, les microglies activées sont très peu nombreuses, la SH est remplie quasiment uniquement par des astrocytes (**figure III-3-9F, G**).

Au niveau de l'hippocampe gauche, le V_t reste encore élevé et stable entre 1 mois et 6 mois, alors nous ne pouvions pas détecter ce signal en utilisant le %ID/cc. Ce signal élevé et stable

correspond probablement à une persistance de l'activité astrocytaire (qui ne retourne jamais à l'état basal sur cette période, **figure III-3-10F, G**).

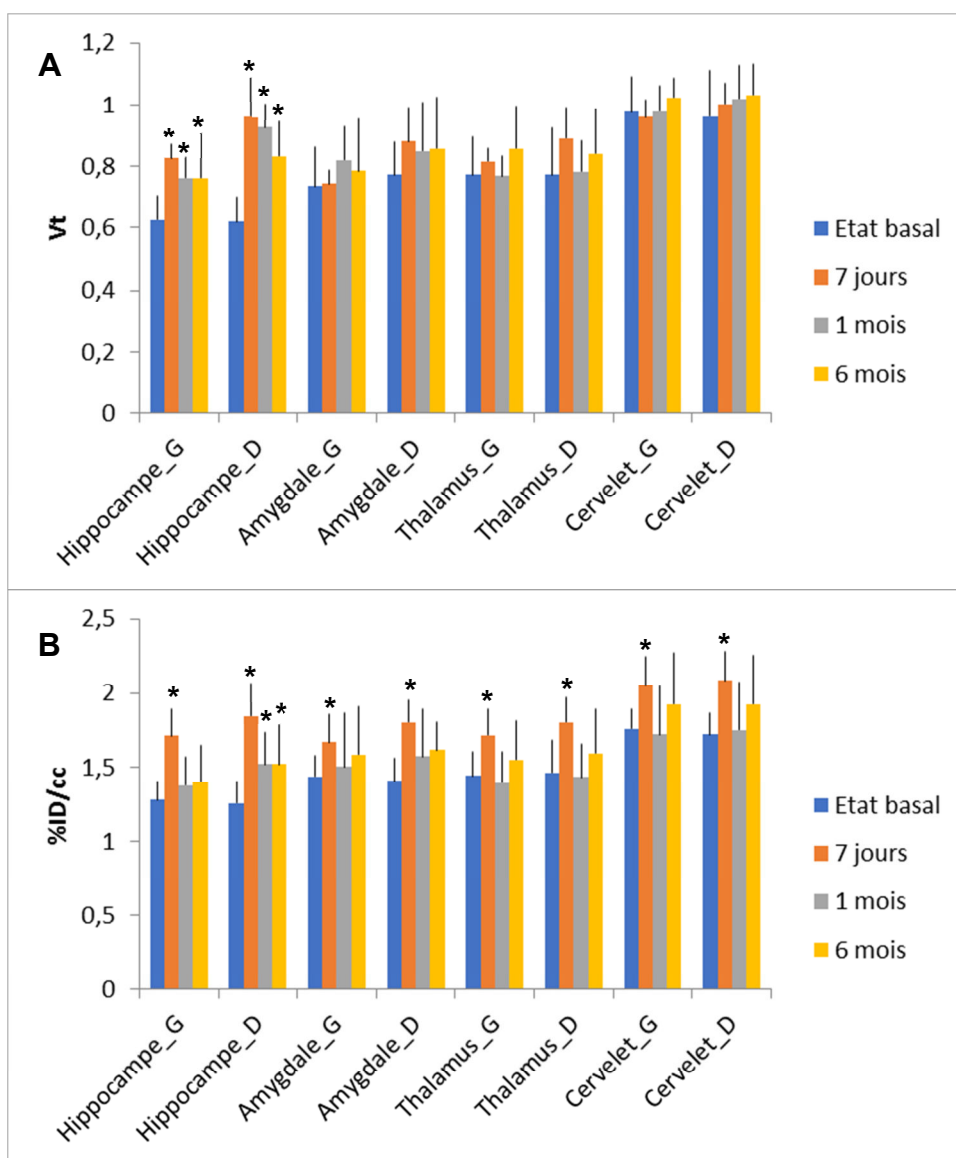


Figure IV-3-12. Evolution de V_t (A) and %ID/cc (B) dans l'hippocampe, l'amygdale, le thalamus et le cervelet sur l'atlas de Dorr. * correspond à la différence significative entre chaque moment après injection d'AK et à l'état basal (t-test apparié).

Une autre observation suggérant la fiabilité de V_t est la stabilité des régions amygdales, du thalamus et du cervelet par rapport à l'état basal. Dans ces régions, la **figure IV-3-10** ne montre pas

de différence significative de V_t entre 7 jours et état basal alors qu'en utilisant le %ID/cc, nous avons trouvé un signal élevé dans l'ensemble de ces régions (atlas de Mirrione, **figure III-3-3C**, atlas de Dorr, **figure IV-3-2**). Ces résultats sont concordants avec les résultats de l'autoradiographie où nous ne trouvons pas le signal élevé au niveau du thalamus et de l'amygdale gauche (**figure III-3-8**). Ils sont aussi concordants avec des lésions extra-hippocampiques très limitées observées chez l'homme (Halász & Rásonyi 2003, Spencer 1998). A l'inverse, les modèles systémiques chez le rat présentent des lésions généralement étendues, qui dépassent largement la région hippocampique, probablement dues à une toxicité élevée de l'injection systémique d'AK ou de pilocarpine qui pourraient être visualisées à la fois sur la TEP et l'autoradiographie (Amhaoul *et al.* 2015, Brackhan *et al.* 2016).

Dans notre modèle, nous ne trouvons que des petits foyers d'hyperfixation localisés transitoirement dans certains noyaux du thalamus et de l'amygdale sur l'autoradiographie (**figure III-3-6**) et l'immunohistologie (**figure III-3-16**), que la résolution spatiale limitée de la microTEP ne peut probablement pas détecter.

Le V_t permet également de détecter des signaux élevés dans différentes régions du cortex et certaines régions (striatum, bulbe olfactif, colliculus) qui ne sont pas attendues chez ce modèle d'épilepsie. Les différences significatives de V_t des différentes régions par rapport à l'état basal sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau IV-3-1. Résumé des valeurs de p (t-test apparié) de chaque région d'intérêt au cours du temps. Le vert signifie que la différence est significative par rapport à l'état basal ($p < 0,05$).

	7 jours	1 mois	6 mois
Entorhinal_G	0,05610	0,03518	0,06741
Entorhinal_D	0,00518	0,00385	0,10053
Frontal_G	0,00304	0,28904	0,02005
Frontal_D	0,00007	0,39282	0,05588
Occipital_G	0,00099	0,06071	0,12584
Occipital_D	0,00015	0,00045	0,00747
Parietal_temporal_G	0,00001	0,01243	0,00783
Parietal_temporal_D	0,00001	0,00338	0,01171
Bulbe_olfactif_G	0,00239	0,07154	0,02853
Bulbe_olfactif_D	0,04719	0,30949	0,27226
Striatum_G	0,02022	0,10839	0,02063
Striatum_D	0,03273	0,15451	0,10349
Superior_colliculus_G	0,02724	0,04699	0,07353
Superior_colliculus_D	0,00004	0,00359	0,00285
Inferior_colliculus_G	0,47255	0,04122	0,15089
Inferior_colliculus_D	0,02713	0,02558	0,14537

Il faut noter que l'expression de TSPO dans ces régions n'est pas nécessairement synonyme de lésion. Elle pourrait ne refléter qu'un circuit ou réseau affecté par les crises épileptiques. Une analyse par immunohistologie dans les zones mises en évidence par la TEP ainsi que des informations fournies par l'EEG pourraient aider à mieux comprendre ces signaux TSPO.

4. Conclusion

Malgré les défis spécifiques aux acquisitions TEP dynamiques chez la souris, nos résultats préliminaires suggèrent qu'une quantification plus précise est possible par rapport à celle classiquement utilisée chez les souris. La prochaine étape consisterait à effectuer une analyse au niveau des voxels pour produire une cartographie de V_t . Avec une telle cartographie, nous espérons pouvoir déterminer le réseau de neuroinflammation lié aux crises épileptiques.

Conclusions générales et perspectives

Le modèle d'EMT chez la souris induit par injection intrahippocampique d'AK avait été validé comme pouvant présenter de grandes analogies avec la pathologie humaine pendant la période d'épileptogénèse et la période d'ictogénèse avec une SH typique et reproductible. La petite taille du cerveau de la souris explique probablement qu'aucune étude d'imagerie n'ai encore été réalisée chez ce modèle malgré l'intérêt qu'il présente.

Ma thèse a donc été consacrée à relever les défis spécifiques associée à la TEP au ^{18}F -DPA-714 ciblant la TSPO chez la souris pour répondre aux questions biologiques concernant la relation entre neuroinflammation et constitution de la SH dans une étude longitudinale chez ce modèle d'épilepsie.

1. Défis spécifiques

Nous avons mis en place un protocole d'acquisition dynamique TEP au ^{18}F -DPA-714 avec un système de perfusion contrôlé. Ce protocole résulte en un pic de la phase vasculaire reproductible entre différents examens, ce qui permet d'envisager des analyses cinétiques complexes pour comprendre les signaux observés. Nous avons également rigoureusement contrôlé la masse injectée de sorte qu'elle ne perturbe pas le comportement physiologique du système étudié.

L'aiguille utilisée pour induire le modèle (injection d'acide kaïnique dans l'hippocampe) a été soigneusement choisie de sorte à limiter les lésions mécaniques tout en conservant une bonne reproductibilité de la procédure d'induction du modèle d'épilepsie.

Même avec une quantification simple consistant à mesurer localement le pourcentage d'activité injecté (%ID/cc), en contrôlant tous les paramètres expérimentaux, nous avons démontré

la faisabilité de l'imagerie TEP au ^{18}F -DPA-714 dans de petites structures cérébrales pour suivre *in vivo* le processus neuroinflammatoire dans une étude longitudinale chez la souris.

Les analyses de données plus complexes (correction de l'effet de volume partiel, estimation de la fonction d'entrée artérielle à partir des images) associées à une modélisation cinétique ont apporté des résultats de quantification de la TSPO plus précis (V_t). Pour valider complètement ces analyses sophistiquées, l'idéal serait de disposer de la vraie fonction d'entrée artérielle mesurée de façon invasive, et des études sont actuellement consacrées à ce nouveau défi dans le laboratoire.

Une prochaine étape consistera à effectuer une analyse au niveau des voxels pour produire une cartographie de V_t . Avec une telle cartographie, nous espérons pouvoir déterminer le réseau de neuroinflammation lié aux crises épileptiques. Un autre challenge sera de chercher la méthode pour estimer le BP_{ND} puisqu'il n'existe pas une vraie zone de référence.

La méthode de modélisation cinétique présentée dans ma thèse n'est pas limitée à ce modèle de souris épileptique mais pourrait s'appliquer également aux examens TEP ciblant la TSPO réalisés sur des modèles transgéniques disponibles qui sont particulièrement importants dans l'étude de la neuroinflammation impliquée en épilepsie.

2. Réponses aux questions biologiques

Nous avons démontré que le pic du signal TSPO était observé durant la période d'épileptogénèse (entre 3 et 14 jours). Ce signal est principalement le fait de la microglie activée surexprimant la protéine TSPO dans l'ensemble de l'hippocampe. Les effets d'une telle activation pourrait être à la fois néfaste entraînant une auto alimentation de la pathologie épileptique (côté injecté) et à la fois protecteur (côté controlatéral). Des études approfondies sont encore nécessaires pour mieux le comprendre l'impact au niveau mécanistique de ces réactions inflammatoires sur la

maladie épileptique. Ainsi, un traitement anti inflammatoire simple comme la minocycline inhibant l'activation microgliale est difficilement envisageable. Il est indispensable de développer des médicaments plus ciblés soit contre des effets néfastes (anti IL-1 β par exemple) soit pour promouvoir des effets protecteurs.

Dans la phase précoce d'ictogénèse (entre 14 jours et 1 mois), le signal TSPO diminue, correspondant à une nette diminution des microglies activées au niveau du hile. Cependant, ce signal reste encore élevé principalement du fait de microglies activées résiduelles dans la couche CA1. La persistance des microglies activées au niveau de CA1 pourrait correspondre à une mort neuronale tardive liée aux crises récurrentes apparues à partir du 14ème jour. Un traitement anti-crise débutant précocement dans cette phase précoce pourrait empêcher potentiellement la mort neuronale dans la couche CA1 et ainsi diminuer le recrutement microglial.

Dans la phase tardive d'ictogénèse (6 mois), nous avons démontré une persistance du signal TSPO élevé dans la SH de la souris épileptique, provenant de différents composants de la cicatrice gliale (astrogliose sévère, accumulation de microglies/macrophages et augmentation de densité vasculaire) qui n'est pas décrit dans d'autres modèles d'épilepsie chez les rongeurs. Ce signal élevé tardif évocateur d'une relation entre la neuroinflammation, la SH et les crises épileptiques pourrait ouvrir une nouvelle fenêtre thérapeutique de l'épilepsie ciblant la neuroinflammation .

La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR, en limitant la prolifération des astrocytes, la migration et la production de médiateurs inflammatoires, pourrait atténuer l'état de mal. L'évaluation de cet inhibiteur dans cette phase tardive pourrait être une nouvelle piste de traitement antiépileptique. Le TSPO étant exprimé par de nombreux types de cellules (microglies, astrocytes, cellules endothéliales), il pourrait également être intéressant de développer de nouveaux traceurs ciblant spécifiquement la voie de signalisation de mTOR pour évaluer des traitements.

Enfin, l'évolution de la densité vasculaire au cours de constitution de SH nécessite encore d'être étudiée, car elle pourrait aider à mieux comprendre son rôle dans l'épilepsie. Le signal TEP TSPO d'origine endothéliale doit être précisément caractérisé dans notre modèle, et possiblement isolé, en faisant l'hypothèse que la BHE crée une différence de cinétique de captation entre la TSPO d'origine endothéliale et celle d'origine gliale.

Pour conclure, ma thèse a démontré l'apport de l'imagerie TEP TSPO pour suivre *in vivo* le processus inflammatoire au cours de la constitution de la sclérose hippocampique. Nos principaux résultats ont permis d'identifier des phases pendant lesquelles des traitements anti-épileptiques ciblant différents composants de la neuroinflammation mériteraient d'être étudiés.

Bibliographies

- Abbott NJ, Ronnback L & Hansson E (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53.
- Amhaoul H, Hamaide J, Bertoglio D, Reichel SN, Verhaeghe J, Geerts E, Van Dam D, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Katsifis A, Van Der Linden A, Staelens S & Dedeurwaerdere S (2015): Brain inflammation in a chronic epilepsy model: Evolving pattern of the translocator protein during epileptogenesis. *Neurobiol Dis* **82**, 526-539.
- Arlicot N, Tronel C, Bodard S, Garreau L, de la Crompe B, Vandeveld I, Guilloteau D, Antier D & Chalon S (2014): Translocator protein (18 kDa) mapping with [125I]-CLINDE in the quinolinic acid rat model of excitotoxicity: a longitudinal comparison with microglial activation, astrogliosis, and neuronal death. *Mol Imaging* **13**, 4-11.
- Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer F, Heppner F, Price G, Wegner F, Giovannoni G, Miller DH, Perkin GD, Smith T, Hewson AK, Bydder G, Kreutzberg GW, Jones T, Cuzner ML & Myers R (2000): The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* **123** (Pt 11), 2321-2337.
- Bao Q, Newport D, Chen M, Stout DB & Chatziioannou AF (2009): Performance evaluation of the inveon dedicated PET preclinical tomograph based on the NEMA NU-4 standards. *J Nucl Med* **50**, 401-408.
- Bauer M, Karch R, Zeitlinger M, Liu J, Koepp MJ, Asselin MC, Sisodiya SM, Hainfellner JA, Wadsak W, Mitterhauser M, Muller M, Pataria E & Langer O (2014): In vivo P-glycoprotein function before and after epilepsy surgery. *Neurology* **83**, 1326-1331.
- Ben-Ari Y & Cossart R (2000): Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* **23**, 580-587.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P & Scheffer IE (2010): Revised

- terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**, 676-685.
- Bernasconi A (2006): Magnetic resonance imaging in intractable epilepsy: focus on structural image analysis. *Adv Neurol* **97**, 273-278.
- Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshe SL, Oz B, Ozkara C, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S & Spreafico R (2013): International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* **54**, 1315-1329.
- Bogdanovic RM, Syvanen S, Michler C, Russmann V, Eriksson J, Windhorst AD, Lammertsma AA, de Lange EC, Voskuyl RA & Potschka H (2014): (R)-[11C]PK11195 brain uptake as a biomarker of inflammation and antiepileptic drug resistance: evaluation in a rat epilepsy model. *Neuropharmacology* **85**, 104-112.
- Bouilleret V (1999) Mécanismes physiopathologiques de la sclérose de l'hippocampe dans un modèle d'épilepsie mésio-temporale chez la souris (Thèse de doctorat). Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A & Le Gal La Salle G (1999): Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **89**, 717-729.
- Bouilleret VD, S (2003): Imagerie fonctionnelle dans l'épilepsie. *EMC - Neurologie*, 1-10.
- Brackhan M, Bascunana P, Postema JM, Ross TL, Bengel FM, Bankstahl M & Bankstahl JP (2016): Serial Quantitative TSPO-Targeted PET Reveals Peak Microglial Activation up to 2 Weeks After an Epileptogenic Brain Insult. *J Nucl Med* **57**, 1302-1308.
- Braestrup C & Squires RF (1977): Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3805-3809.

- Breuer H (2016) Imaging and pharmacotherapy of blood-brain barrier impairment during epileptogenesis (Doctoral dissertation). In *Department of Nuclear Medicine, Preclinical Molecular Imaging*. Hannover Medical School, Hannover, Germany.
- Butler T, Li Y, Tsui W, Friedman D, Maoz A, Wang X, Harvey P, Tanzi E, Morim S, Kang Y, Mosconi L, Talos D, Kuzniecky R, Vallhabjosula S, Thesen T, Glodzik L, Ichise M, Silbersweig D, Stern E, de Leon MJ & French J (2016): Transient and chronic seizure-induced inflammation in human focal epilepsy. *Epilepsia* **57**, e191-194.
- Cascino GD, Jack CR, Jr., Parisi JE, Sharbrough FW, Hirschorn KA, Meyer FB, Marsh WR & O'Brien PC (1991): Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol* **30**, 31-36.
- Cavalheiro EA, Riche DA & Le Gal La Salle G (1982): Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **53**, 581-589.
- Cendes F, Andermann F, Gloor P, Lopes-Cendes I, Andermann E, Melanson D, Jones-Gotman M, Robitaille Y, Evans A & Peters T (1993): Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? *Ann Neurol* **34**, 795-801.
- Cendes F, Theodore WH, Brinkmann BH, Sulc V & Cascino GD (2016): Neuroimaging of epilepsy. *Handb Clin Neurol* **136**, 985-1014.
- Chen MK & Guilarte TR (2008): Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* **118**, 1-17.
- Chow PL, Rannou FR & Chatziioannou AF (2005): Attenuation correction for small animal PET tomographs. *Phys Med Biol* **50**, 1837-1850.
- Chugani HT, Luat AF, Kumar A, Govindan R, Pawlik K & Asano E (2013): alpha-[11C]-Methyl-L-tryptophan--PET in 191 patients with tuberous sclerosis complex. *Neurology* **81**, 674-680.

- Coan AC, Campos BM, Yasuda CL, Kubota BY, Bergo FP, Guerreiro CA & Cendes F (2014): Frequent seizures are associated with a network of gray matter atrophy in temporal lobe epilepsy with or without hippocampal sclerosis. *PLoS One* **9**, e85843.
- Constantinescu CC & Mukherjee J (2009): Performance evaluation of an Inveon PET preclinical scanner. *Phys Med Biol* **54**, 2885-2899.
- Cosenza-Nashat M, Zhao ML, Suh HS, Morgan J, Natividad R, Morgello S & Lee SC (2009): Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* **35**, 306-328.
- Damont A, Hinnen F, Kuhnast B, Schöllhorn-Peyronneau MA, James M, Luus C, Tavitian B, Kassiou M & Dollé F (2008): Radiosynthesis of [18F]DPA-714, a selective radioligand for imaging the translocator protein (18 kDa) with PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **51**, 286-292.
- de Lanerolle NC, Brines ML, Kim JH, Williamson A, Philips MF & Spencer DD (1992): Neurochemical remodelling of the hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* **9**, 205-219; discussion 220.
- de Vries EF, Dierckx RA & Klein HC (2006): Nuclear imaging of inflammation in neurologic and psychiatric disorders. *Curr Clin Pharmacol* **1**, 229-242.
- de Vries EF, Doorduyn J, Dierckx RA & van Waarde A (2008): Evaluation of [(11)C]rofecoxib as PET tracer for cyclooxygenase 2 overexpression in rat models of inflammation. *Nucl Med Biol* **35**, 35-42.
- Dedeurwaerdere S, Callaghan PD, Pham T, Rahardjo GL, Amhaoul H, Berghofer P, Quinlivan M, Mattner F, Loc'h C, Katsifis A & Gregoire MC (2012): PET imaging of brain inflammation during early epileptogenesis in a rat model of temporal lobe epilepsy. *EJNMMI Res* **2**, 60.
- Defrise M, Kinahan PE, Townsend DW, Michel C, Sibomana M & Newport DF (1997): Exact and approximate rebinning algorithms for 3-D PET data. *IEEE Trans Med Imaging* **16**, 145-158.

- Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C, European Federation of Pharmaceutical Industries A & European Centre for the Validation of Alternative M (2001): A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* **21**, 15-23.
- Dolle F, Luus C, Reynolds A & Kassiou M (2009): Radiolabelled molecules for imaging the translocator protein (18 kDa) using positron emission tomography. *Curr Med Chem* **16**, 2899-2923.
- Dorr AE, Lerch JP, Spring S, Kabani N & Henkelman RM (2008): High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *Neuroimage* **42**, 60-69.
- Duncan JS (1997): Imaging and epilepsy. *Brain* **120** (Pt 2), 339-377.
- Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R & Valliant JF (2007): Justifying the number of animals for each experiment. *Nucl Med Biol* **34**, 229-232.
- Ende GR, Laxer KD, Knowlton RC, Matson GB, Schuff N, Fein G & Weiner MW (1997): Temporal lobe epilepsy: bilateral hippocampal metabolite changes revealed at proton MR spectroscopic imaging. *Radiology* **202**, 809-817.
- Engel J, Jr., Henry TR, Risinger MW, Mazziotta JC, Sutherling WW, Levesque MF & Phelps ME (1990): Presurgical evaluation for partial epilepsy: relative contributions of chronic depth-electrode recordings versus FDG-PET and scalp-sphenoidal ictal EEG. *Neurology* **40**, 1670-1677.
- Engel JD, MA; Schwartzkroin, PA (1997b) *Basic mechanisms of human epilepsy*. Raven Press, Philadelphia.
- Engel JW, PD; Wieser, HG (1997a) *Mesial temporal lobe epilepsy*. Raven press, Philadelphia.
- Erlandsson K, Buvat I, Pretorius PH, Thomas BA & Hutton BF (2012): A review of partial volume correction techniques for emission tomography and their applications in neurology, cardiology and oncology. *Phys Med Biol* **57**, R119-159.

- Evans E, Buonincontri G, Izquierdo D, Methner C, Hawkes RC, Ansorge RE, Krieg T, Carpenter TA & Sawiak SJ (2015): Combining MRI with PET for partial volume correction improves image-derived input functions in mice. *IEEE Trans Nucl Sci* **62**, 628-633.
- Eyo UB, Murugan M & Wu LJ (2017): Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia* **65**, 5-18.
- Feldmann M, Asselin MC, Liu J, Wang S, McMahon A, Anton-Rodriguez J, Walker M, Symms M, Brown G, Hinz R, Matthews J, Bauer M, Langer O, Thom M, Jones T, Vollmar C, Duncan JS, Sisodiya SM & Koepp MJ (2013): P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Lancet Neurol* **12**, 777-785.
- Frost JJ, Mayberg HS, Fisher RS, Douglass KH, Dannals RF, Links JM, Wilson AA, Ravert HT, Rosenbaum AE, Snyder SH & et al. (1988): Mu-opiate receptors measured by positron emission tomography are increased in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **23**, 231-237.
- Gargiulo S, Anzilotti S, Coda AR, Gramanzini M, Greco A, Panico M, Vinciguerra A, Zannetti A, Vicidomini C, Dolle F, Pignataro G, Quarantelli M, Annunziato L, Brunetti A, Salvatore M & Pappata S (2016): Imaging of brain TSPO expression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis with (18)F-DPA-714 and micro-PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **43**, 1348-1359.
- Gershen LD, Zanotti-Fregonara P, Dustin IH, Liow JS, Hirvonen J, Kreisl WC, Jenko KJ, Inati SK, Fujita M, Morse CL, Brouwer C, Hong JS, Pike VW, Zoghbi SS, Innis RB & Theodore WH (2015): Neuroinflammation in Temporal Lobe Epilepsy Measured Using Positron Emission Tomographic Imaging of Translocator Protein. *JAMA Neurol* **72**, 882-888.
- Goffin K, Dedeurwaerdere S, Van Laere K & Van Paesschen W (2008): Neuronuclear assessment of patients with epilepsy. *Semin Nucl Med* **38**, 227-239.
- Groticke I, Hoffmann K & Loscher W (2008): Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Exp Neurol* **213**, 71-83.

- Guillemin GJ & Brew BJ (2004): Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* **75**, 388-397.
- Gunn RN, Lammertsma AA, Hume SP & Cunningham VJ (1997): Parametric imaging of ligand-receptor binding in PET using a simplified reference region model. *Neuroimage* **6**, 279-287.
- Hailer NP (2008): Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol* **84**, 211-233.
- Halász P & Rásonyi G (2003): The Network or System-oriented Approach in Understanding Human Epilepsy (Comments on the article of Susan S. Spencer: "Neural Networks in Human Epilepsy: Evidence of and Implications for Treatment"). *Epilepsia* **44**, 625-625.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F & Graeve L (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 297-314.
- Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J & Borlongan CV (2013): Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol* **4**, 30.
- Hirvonen J, Kreisl WC, Fujita M, Dustin I, Khan O, Appel S, Zhang Y, Morse C, Pike VW, Innis RB & Theodore WH (2012): Increased in vivo expression of an inflammatory marker in temporal lobe epilepsy. *J Nucl Med* **53**, 234-240.
- Hume SP, Gunn RN & Jones T (1998): Pharmacological constraints associated with positron emission tomographic scanning of small laboratory animals. *Eur J Nucl Med* **25**, 173-176.
- Israel I, Ohsiek A, Al-Momani E, Albert-Weissenberger C, Stetter C, Mencl S, Buck AK, Kleinschnitz C, Samnick S & Siren AL (2016): Combined [(18)F]DPA-714 micro-positron emission tomography and autoradiography imaging of microglia activation after closed head injury in mice. *J Neuroinflammation* **13**, 140.
- James ML, Belichenko NP, Nguyen TV, Andrews LE, Ding Z, Liu H, Bodapati D, Arksey N, Shen B, Cheng Z, Wyss-Coray T, Gambhir SS, Longo FM & Chin FT (2015): PET imaging of translocator protein (18 kDa) in a mouse model of Alzheimer's disease using N-(2,5-dimethoxybenzyl)-2-18F-fluoro-N-(2-phenoxyphenyl)acetamide. *J Nucl Med* **56**, 311-316.

- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS & Leite JP (2014): Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* **10**, 1693-1705.
- Korkhov VM, Sachse C, Short JM & Tate CG (2010): Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. *Structure* **18**, 677-687.
- Kumar A, Asano E & Chugani HT (2011): alpha-[(1)(1)C]-methyl-L-tryptophan PET for tracer localization of epileptogenic brain regions: clinical studies. *Biomark Med* **5**, 577-584.
- Kuntner C & Stout D (2014): Quantitative preclinical PET imaging: opportunities and challenges. *Frontiers in Physics* **2**.
- Kwan P & Brodie MJ (2002): Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure* **11**, 77-84.
- Labate A, Gambardella A, Aguglia U, Condino F, Ventura P, Lanza P & Quattrone A (2010): Temporal lobe abnormalities on brain MRI in healthy volunteers: a prospective case-control study. *Neurology* **74**, 553-557.
- Lammertsma AA & Hume SP (1996): Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *Neuroimage* **4**, 153-158.
- Lartey FM, Ahn GO, Shen B, Cord KT, Smith T, Chua JY, Rosenblum S, Liu H, James ML, Chernikova S, Lee SW, Pisani LJ, Tirouvanziam R, Chen JW, Palmer TD, Chin FT, Guzman R, Graves EE & Loo BW, Jr. (2014): PET imaging of stroke-induced neuroinflammation in mice using [18F]PBR06. *Mol Imaging Biol* **16**, 109-117.
- Laube M, Kniess T & Pietzsch J (2013): Radiolabeled COX-2 inhibitors for non-invasive visualization of COX-2 expression and activity--a critical update. *Molecules* **18**, 6311-6355.
- Liu B, Le KX, Park MA, Wang S, Belanger AP, Dubey S, Frost JL, Holton P, Reiser V, Jones PA, Trigg W, Di Carli MF & Lemere CA (2015): In Vivo Detection of Age- and Disease-Related Increases in Neuroinflammation by 18F-GE180 TSPO MicroPET Imaging in Wild-Type and Alzheimer's Transgenic Mice. *J Neurosci* **35**, 15716-15730.

- Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wolf AP, Dewey SL, Schlyer DJ, MacGregor RR, Hitzemann R, Bendriem B, Gatley SJ & et al. (1990): Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**, 740-747.
- Loiseau J, Loiseau P, Duche B, Guyot M, Dartigues JF & Aublet B (1990a): A survey of epileptic disorders in southwest France: seizures in elderly patients. *Ann Neurol* **27**, 232-237.
- Loiseau J, Loiseau P, Guyot M, Duche B, Dartigues JF & Aublet B (1990b): Survey of seizure disorders in the French southwest. I. Incidence of epileptic syndromes. *Epilepsia* **31**, 391-396.
- Lowenstein DH, Bleck T & Macdonald RL (1999): It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* **40**, 120-122.
- Ma Y, Hof PR, Grant SC, Blackband SJ, Bennett R, Slate L, McGuigan MD & Benveniste H (2005): A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Neuroscience* **135**, 1203-1215.
- Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M & Suhara T (2007): Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* **27**, 10957-10968.
- Majo VJ, Prabhakaran J, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ & Kumar JS (2005): A general method for the synthesis of aryl [11C]methylsulfones: potential PET probes for imaging cyclooxygenase-2 expression. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 4268-4271.
- Mandrekar-Colucci S & Landreth GE (2010): Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**, 156-167.
- Marchi N, Granata T, Ghosh C & Janigro D (2012): Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia* **53**, 1877-1886.

- Martin A, Boisgard R, Theze B, Van Camp N, Kuhnast B, Damont A, Kassiou M, Dolle F & Tavitian B (2010): Evaluation of the PBR/TSPO radioligand [(18)F]DPA-714 in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 230-241.
- Mayberg HS, Sadzot B, Meltzer CC, Fisher RS, Lesser RP, Dannals RF, Lever JR, Wilson AA, Ravert HT, Wagner HN, Jr. & et al. (1991): Quantification of mu and non-mu opiate receptors in temporal lobe epilepsy using positron emission tomography. *Ann Neurol* **30**, 3-11.
- Mirzaei N, Tang SP, Ashworth S, Coello C, Plisson C, Passchier J, Selvaraj V, Tyacke RJ, Nutt DJ & Sastre M (2016): In vivo imaging of microglial activation by positron emission tomography with [(11)C]PBR28 in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Glia* **64**, 993-1006.
- Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA & Sofroniew MV (2006): Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* **129**, 2761-2772.
- Notter T, Coughlin JM, Gschwind T, Weber-Stadlbauer U, Wang Y, Kassiou M, Vernon AC, Benke D, Pomper MG, Sawa A & Meyer U (2017): Translational evaluation of translocator protein as a marker of neuroinflammation in schizophrenia. *Mol Psychiatry*.
- O'Brien TJ, So EL, Mullan BP, Hauser MF, Brinkmann BH, Bohnen NI, Hanson D, Cascino GD, Jack CR, Jr. & Sharbrough FW (1998): Subtraction ictal SPECT co-registered to MRI improves clinical usefulness of SPECT in localizing the surgical seizure focus. *Neurology* **50**, 445-454.
- OMS (2017) Epilepsie, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/fr/>.
- Ory D, Postnov A, Koole M, Celen S, de Laat B, Verbruggen A, Van Laere K, Bormans G & Casteels C (2016): Quantification of TSPO overexpression in a rat model of local neuroinflammation induced by intracerebral injection of LPS by the use of [(18)F]DPA-714 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **43**, 163-172.

- Owen DR, Yeo AJ, Gunn RN, Song K, Wadsworth G, Lewis A, Rhodes C, Pulford DJ, Bennacef I, Parker CA, StJean PL, Cardon LR, Mooser VE, Matthews PM, Rabiner EA & Rubio JP (2012): An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1-5.
- Panayiotopoulos C (2005) *Brain Imaging in the Diagnosis and Management of Epilepsies*. Bladon Medical Publishing, Oxfordshire.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR & Gavish M (2006): Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 402-409.
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A & Bessis A (2012): Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E197-205.
- Paxinos G & Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2 edn. Academic Press, San Diego.
- Pernot F, Heinrich C, Barbier L, Peinnequin A, Carpentier P, Dhote F, Baille V, Beaup C, Depaulis A & Dorandeu F (2011): Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **52**, 2315-2325.
- Peyronneau MA, Saba W, Goutal S, Damont A, Dolle F, Kassiou M, Bottlaender M & Valette H (2013): Metabolism and quantification of [(18F)]DPA-714, a new TSPO positron emission tomography radioligand. *Drug Metab Dispos* **41**, 122-131.
- Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E & Vezzani A (2008): Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **29**, 142-160.
- Reilhac A, Charil A, Wimberley C, Angelis G, Hamze H, Callaghan P, Garcia MP, Boisson F, Ryder W, Meikle SR & Gregoire MC (2015): 4D PET iterative deconvolution with

- spatiotemporal regularization for quantitative dynamic PET imaging. *Neuroimage* **118**, 484-493.
- Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C & Depaulis A (2002): Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **112**, 101-111.
- Robel S, Buckingham SC, Boni JL, Campbell SL, Danbolt NC, Riedemann T, Sutor B & Sontheimer H (2015): Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *J Neurosci* **35**, 3330-3345.
- Rodgers KM, Hutchinson MR, Northcutt A, Maier SF, Watkins LR & Barth DS (2009): The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. *Brain* **132**, 2478-2486.
- Russmann V, Brendel M, Mille E, Helm-Vicidomini A, Beck R, Gunther L, Lindner S, Rominger A, Keck M, Salvamoser JD, Albert NL, Bartenstein P & Potschka H (2017): Identification of brain regions predicting epileptogenesis by serial [18F]GE-180 positron emission tomography imaging of neuroinflammation in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroimage Clin* **15**, 35-44.
- Savic I, Persson A, Roland P, Pauli S, Sedvall G & Widen L (1988): In-vivo demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *Lancet* **2**, 863-866.
- Scarf AM, Ittner LM & Kassiou M (2009): The translocator protein (18 kDa): central nervous system disease and drug design. *J Med Chem* **52**, 581-592.
- Schwarcz R, Zaczek R & Coyle JT (1978): Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* **50**, 209-220.
- Shen X, Dong Y, Xu Z, Wang H, Miao C, Soriano SG, Sun D, Baxter MG, Zhang Y & Xie Z (2013): Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. *Anesthesiology* **118**, 502-515.

- Sofroniew MV (2009): Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* **32**, 638-647.
- Sofroniew MV & Vinters HV (2010): Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35.
- Spencer SS (1994): The relative contributions of MRI, SPECT, and PET imaging in epilepsy. *Epilepsia* **35 Suppl 6**, S72-89.
- Spencer SS (1998): Substrates of localization-related epilepsies: biologic implications of localizing findings in humans. *Epilepsia* **39**, 114-123.
- Streit WJ, Walter SA & Pennell NA (1999): Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* **57**, 563-581.
- Suckow C, Kuntner C, Chow P, Silverman R, Chatziioannou A & Stout D (2009): Multimodality rodent imaging chambers for use under barrier conditions with gas anesthesia. *Mol Imaging Biol* **11**, 100-106.
- Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen JC & Onteniente B (1995): Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* **64**, 665-674.
- Tang D, McKinley ET, Hight MR, Uddin MI, Harp JM, Fu A, Nickels ML, Buck JR & Manning HC (2013): Synthesis and structure-activity relationships of 5,6,7-substituted pyrazolopyrimidines: discovery of a novel TSPO PET ligand for cancer imaging. *J Med Chem* **56**, 3429-3433.
- Theodore WH, Martinez AR, Khan OI, Liew CJ, Auh S, Dustin IM, Heiss J & Sato S (2012): PET of serotonin 1A receptors and cerebral glucose metabolism for temporal lobectomy. *J Nucl Med* **53**, 1375-1382.
- Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Spanaki MV, Der MG, Fazilat S, Kopylev L, Herscovitch P, Eckelman WC & Theodore WH (2003): PET imaging of 5-HT1A receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* **60**, 749-756.

- Veenman L, Leschiner S, Spanier I, Weisinger G, Weizman A & Gavish M (2002): PK 11195 attenuates kainic acid-induced seizures and alterations in peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) protein components in the rat brain. *J Neurochem* **80**, 917-927.
- Veiga S, Carrero P, Pernia O, Azcoitia I & Garcia-Segura LM (2007): Translocator protein 18 kDa is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia* **55**, 1426-1436.
- Venneti S, Lopresti BJ & Wiley CA (2006): The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* **80**, 308-322.
- Veronese M, Reis Marques T, Bloomfield PS, Rizzo G, Singh N, Jones D, Agushi E, Mosses D, Bertoldo A, Howes O, Roncaroli F & Turkheimer FE (2017): Kinetic modelling of [11C]PBR28 for 18 kDa translocator protein PET data: A validation study of vascular modelling in the brain using XBD173 and tissue analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 271678X17712388.
- Vezzani A, French J, Bartfai T & Baram TZ (2011): The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* **7**, 31-40.
- Vicidomini C, Panico M, Greco A, Gargiulo S, Coda AR, Zannetti A, Gramanzini M, Roviello GN, Quarantelli M, Alfano B, Tavitian B, Dolle F, Salvatore M, Brunetti A & Pappata S (2015): In vivo imaging and characterization of [(18F)]DPA-714, a potential new TSPO ligand, in mouse brain and peripheral tissues using small-animal PET. *Nucl Med Biol* **42**, 309-316.
- Vincent P & Mulle C (2009): Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* **158**, 309-323.
- Vines DC, Green DE, Kudo G & Keller H (2011): Evaluation of mouse tail-vein injections both qualitatively and quantitatively on small-animal PET tail scans. *J Nucl Med Technol* **39**, 264-270.
- Visser EP, Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Gotthardt M, Oyen WJ & Boerman OC (2009): Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. *J Nucl Med* **50**, 139-147.

- von Lehe M, Lutz M, Kral T, Schramm J, Elger CE & Clusmann H (2006): Correlation of health-related quality of life after surgery for mesial temporal lobe epilepsy with two seizure outcome scales. *Epilepsy Behav* **9**, 73-82.
- Watson CC (2000): New, faster, image-based scatter correction for 3D PET. *IEEE Transactions on Nuclear Science* **47**, 1587-1594.
- Wetherington J, Serrano G & Dingledine R (2008): Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* **58**, 168-178.
- Wimberley C, Angelis G, Boisson F, Callaghan P, Fischer K, Pichler BJ, Meikle SR, Gregoire MC & Reilhac A (2014): Simulation-based optimisation of the PET data processing for partial saturation approach protocols. *Neuroimage* **97**, 29-40.
- Wimberley C, Lavis S, Brulon V, Peyronneau MA, Leroy C, Bodini B, Remy P, Stankoff B, Buvat I & Bottlaender M (2017): Impact of endothelial TSPO on the quantification of 18F-DPA-714. *J Nucl Med*.
- Wu Y & Carson RE (2002): Noise reduction in the simplified reference tissue model for neuroreceptor functional imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1440-1452.
- Xavier AL, Menezes JR, Goldman SA & Nedergaard M (2014): Fine-tuning the central nervous system: microglial modelling of cells and synapses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**, 20130593.
- Yu AR, Kim JS, Kang JH & Lim SM (2015): Comparison of reconstruction methods and quantitative accuracy in Siemens Inveon PET scanner. *Journal of Instrumentation* **10**, P04001-P04001.
- Zattoni M, Mura ML, Deprez F, Schwendener RA, Engelhardt B, Frei K & Fritschy JM (2011): Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **31**, 4037-4050.

Titre : Apport de l'imagerie TEP TSPO dans un modèle d'épilepsie méso-temporale chez la souris

Mots clés : TSPO, TEP ^{18}F -DPA-714, épilepsie méso-temporale, modèle animal, neuroinflammation

Résumé: Le modèle induit par injection unilatérale intrahippocampique d'acide kaïnique chez la souris présente de grandes analogies avec l'épilepsie méso-temporale (EMT) chez l'homme caractérisée par la période d'épileptogénèse et par une sclérose hippocampique (SH) typique.

De récents travaux *ex vivo* ont révélé l'existence de processus neuroinflammatoires au niveau de la SH chez des patients épileptiques et dans des modèles animaux. La protéine translocatrice de 18kDa (TSPO), la plus étudiée actuellement au moyen de différents traceurs, est considérée comme une cible de référence pour visualiser et quantifier la neuroinflammation.

Ma thèse a donc eu pour objectif de déterminer l'évolution de l'expression de TSPO au cours de la constitution de la SH à l'aide de la Tomographie par émission de positons (TEP) au

^{18}F -DPA-714 dans une étude longitudinale chez ce modèle d'EMT, et à identifier son origine à partir d'analyses d'immunohistofluorescence.

Nous avons démontré la faisabilité de la TEP pour suivre *in vivo* le processus inflammatoire même dans de petites structures cérébrales à la fois par la mesure locale du pourcentage d'activité injectée et par l'estimation du volume de distribution.

Le signal maximum a été observé durant l'épileptogénèse et correspondait aux microglies activées puis il diminuait mais persistait lorsque la SH était bien établie, et était alors principalement lié aux astrocytes activés.

Nos principaux résultats ont permis d'identifier les phases pendant lesquelles de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant différents composants de la neuroinflammation mériteraient d'être étudiés.

Title : Role of TSPO PET imaging in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy

Keywords : TSPO, ^{18}F -DPA-714, mesial temporal lobe epilepsy, animal model, neuroinflammation

Abstract: The model induced by unilateral injection of kainic acid is considered as the best reliable model for the mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) and reproduces the epileptogenesis and the typical hippocampal sclerosis (HS).

Recent *ex vivo* studies have revealed the existence of neuroinflammation in the HS of epileptic patients and animal models. The 18kDa translocator protein (TSPO), which is currently the most widely studied with various radiotracers, is considered as a reference target to visualize and quantify the neuroinflammation.

In that context, my thesis focused on determining the evolution of TSPO during the constitution of HS using ^{18}F -DPA-714 positrons emission tomography (PET) in a longitudinal study in this mouse model, and to

identify its origin from immunohistofluorescence analysis.

We demonstrated the feasibility of PET to monitor *in vivo* the inflammatory process even in small cerebral structures both by the local measurement of the percent injected dose or by the measurement of the volume of distribution.

The peak signal was found during the epileptogenesis and corresponded to activated microglia, and then this signal decreased but persisted after the HS was well established, and mainly originated from activated astrocytes during this period.

Our main results allowed us to identify different phases during which potential anti-epileptic treatment targeting different components of neuroinflammation could be investigated.