HAL
open science

Développement préclinique et clinique du [18F]F13640 pour l'imagerie des récepteurs 5-HT1A cérébraux

Matthieu Colom

To cite this version:

Matthieu Colom. Développement préclinique et clinique du [18F]F13640 pour l'imagerie des récepteurs 5-HT1A cérébraux. Neurosciences. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1219 . tel-03336910

HAL Id: tel-03336910

https://theses.hal.science/tel-03336910v1

Submitted on 7 Sep 2021

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.

N°d'ordre NNT : 2020LYSE1219

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°476
« Neurosciences et Cognition »

Spécialité de doctorat : **Neurosciences**
Discipline : **Neuropharmacologie**

Soutenue publiquement le 02/11/2020 par

Matthieu COLOM

Développement préclinique et clinique du [^{18}F]F13640 pour l'imagerie des récepteurs 5-HT$_{1A}$ cérébraux

---

Devant le jury composé de :

Pr Philippe BOULINGUEZ - Université de Lyon - Président

Dr Sylvie CHALON - INSERM Tours - Rapporteure

Dr Nicolas TOURNIER - Université Paris Sud-CEA - Rapporteur

Pr François DAUPHIN - Université de Caen Normandie - Examinateur

Dr Véronique SGAMBATO - INSERM Lyon - Examinatrice

Pr Luc ZIMMER - Université de Lyon-Hospices Civils de Lyon - Directeur de thèse

Dr Adrian NEWMAN-TANCREDI – NEUROLIXIS Castres - Invité

Ce doctorat a été réalisé au sein de l'équipe de recherche BIORAN

- Biomarqueurs radiopharmaceutiques et neurochimiques (Pr. Luc Zimmer) -

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon

INSERM U1028 – CNRS UMR5292

En collaboration avec le CERMEP et les Hospices Civils de Lyon

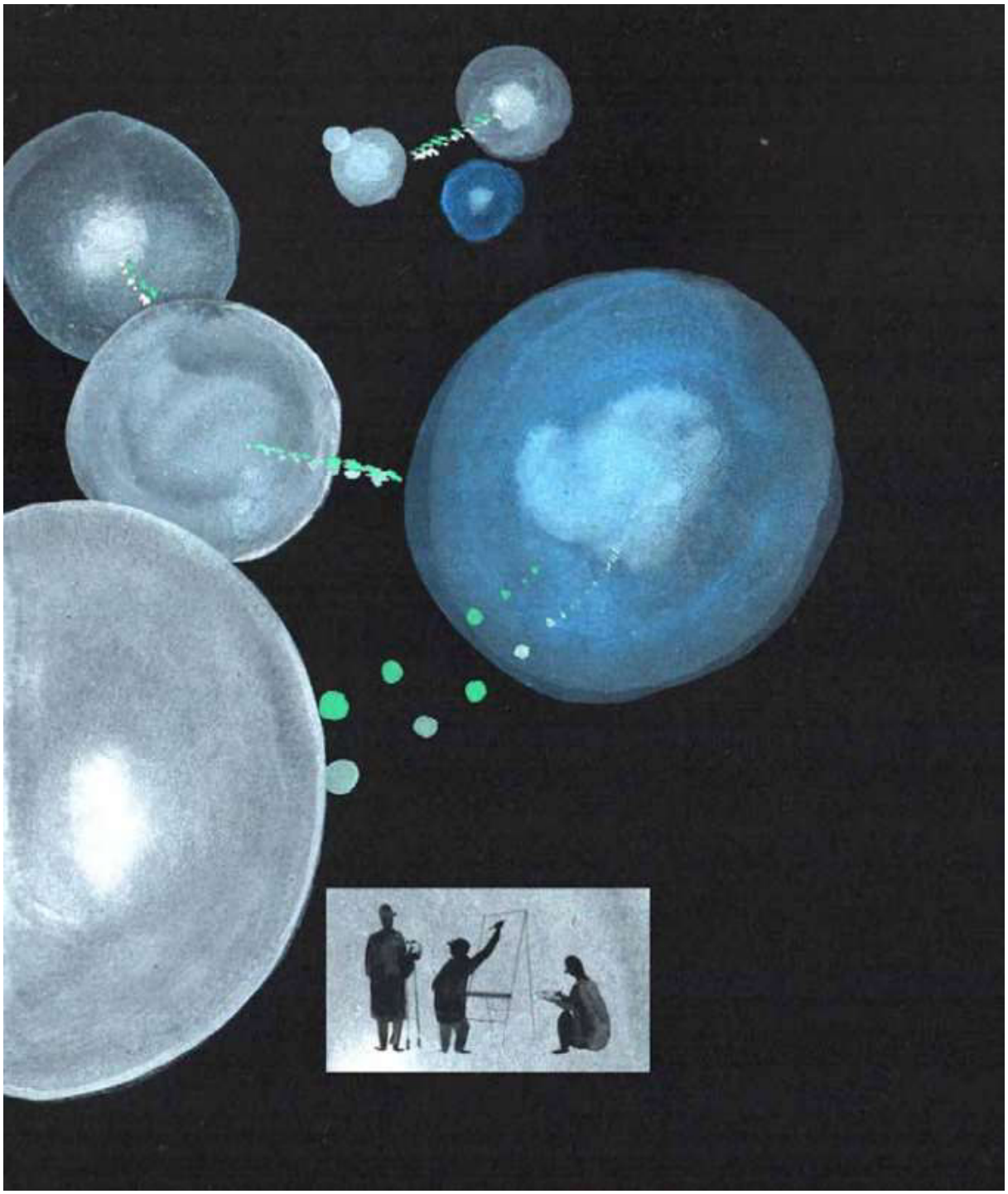


Illustration Emilie Josso : https://emiliejo.net/

REMERCIEMENTS

A Luc Zimmer

Merci de m'avoir accompagné durant ces nombreuses années, du mémoire de Master 1 à la Thèse de Sciences. Je suis satisfait du marathon scientifico-réglementaire effectué pour amener le [^{18}F]F13640 chez l'homme. J'espère que s'en suivront de nombreuses explorations neuropathologiques !

A Adrian

Merci d'avoir transmis toute ton énergie et ton optimisme pour le développement de nouvelles molécules aux mécanismes neuropharmacologiques passionnant.

Au jury

Je vous suis reconnaissant de participer à l'évaluation de ce travail.

A Valentine Bréant

Merci de m'avoir permis d'exercer la pharmacie hospitalière au GHE pendant mon internat.

A l'équipe BIORAN

Merci pour toutes ces années passées ensemble et pleines de rebondissements. Je remercie tous ceux qui de près ou de loin ont participé à ce travail (Benjamin V, Jérôme R, Nicolas C, Caroline B, Inès M, Véronique B, Zacharie I, Franck L, Véronique G, Sylvain F, Thibault I, Thierry B, Didier L).

A ma famille

Je vous suis infiniment reconnaissant du soutien apporté pendant ces longues années. Ce travail est aussi le vôtre. C'est pourquoi je vous le dédie tout particulièrement.

A la team choco et autres

Merci pour tous ces moments de créativité sportive (Guillaume), d'envie (Maxime L), de dépassement alpin (Vincent), de motivation (Charlotte), d'aventures (Charlélie), d'hospitalité accompagnée de tartes aux myrtilles et autres délices gastronomiques (Christine D), de tour d'horizon des 4000 (Eric D), de farcement (Stacy), de Revard (Audric), de tour de Grande Casse pluvieux (Margaux), d'endurance sans limites (Laurent), de sourires (Gaspard), de sérénité (Octave). J'inclus aussi tous les one shot dans ce travail !

A Maxime, Tristan, Thibaut, Thibault, Louis, pour ces bons moments partagés.

Merci à Alban pour ces sorties parapente haletantes et pleines de thermiques. Je les inclus aussi dans cette thèse.

A C.B

Merci pour ton soutien. Le meilleur reste à venir !

Aux internes Merci à tous les internes du GHE et aux semestres pleins d'attaques et de défense de lanterne. Je porte une attention particulière au pool des cools.

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

RESUME EN FRANÇAIS

Les radiotraceurs en TEP sont des outils de neuropharmacologie pour l'exploration des récepteurs couplés aux protéines G. L'une de leurs applications est la mesure des taux de neurotransmetteurs endogènes dans la synapse. Aucun radiotraceur n'est totalement validé pour mesurer indirectement le taux basal d'un neurotransmetteur. Si le développement des premiers radiotraceurs dopaminergiques a pu montrer leur sensibilité à la libération de dopamine lors de défi pharmacologique aux amphétamines, le modèle ligand récepteur a montré ses limites. Autrement dit, certains phénomènes jusque-là inexpliqués par le modèle ont été observés *in vivo.* Des hypothèses ont été formulées à l'aide des données obtenues *in vitro* pour repenser ce modèle. Elles indiquent notamment l'existence de deux types de sites de liaison sur les récepteurs couplés aux protéines G. Un agoniste se lie aux sites de haute affinité situés sur les récepteurs fonctionnels couplés aux protéines G. Un antagoniste se fixe sur les sites de basse affinité présents à la fois sur les récepteurs couplés et non couplés aux protéines G. Il semblerait que la propriété agoniste du radiotraceur soit plus favorable pour assurer une sensibilité au neurotransmetteur endogène de par sa compétition sur les mêmes sites que ce dernier. A ce jour, la majorité des radiotraceurs TEP sont des antagonistes. Cela pourrait expliquer le nombre important d'échecs pour montrer leur sensibilité aux neurotransmetteurs endogènes. Dans ce travail de thèse, nous montrons en quoi le statut de radiotraceur agoniste TEP repense la neuropharmacologie au moyen d'une revue de la littérature. Par ailleurs, les expériences précliniques avec le nouveau radiotraceur agoniste 5-HT_{1A}, le [^{18}F]F13640, montrent de façon inédite sa sensibilité à la libération de sérotonine alors que ses homologues antagonistes indiquent des résultats plus contrastés. Ces éléments soulignent l'importance de comparer l'imagerie des radiotraceurs agonistes et antagonistes. Ils promeuvent le développement du [^{18}F]F13640 et des radiotraceurs agonistes pour alimenter l'approche fonctionnelle de la pharmacologie en TEP.

Mots clés : Neuropharmacologie, Récepteurs 5-HT_{1A}, Tomographie par Emission de Positons, Récepteurs couplés aux Protéines G, Agonistes

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

PET radiotracers are useful tools in neuropharmacology to explore receptors coupled to G proteins. One of the their highly coveted properties is measuring the synaptic levels of endogenous neurotransmitter. To date, no radiotracer has been validated for this application. If the development of the first dopaminergic radiotracers could show their sensitivity to the release of dopamine during pharmacological challenge with amphetamines, the receptor ligand model showed its limits. In other words, certain phenomena hitherto unexplained by the model have been observed *in vivo*. Hypotheses have been formulated using *in vitro* data to rethink this model. They indicate in particular the existence of 2 types of binding sites on the receptors coupled to the G proteins. An agonist binds to the high affinity sites located on the functional receptors coupled to the G proteins. An antagonist binds to the low affinity sites located on both receptors coupled and not coupled to G proteins. It would suggest that the agonist property is more favorable for ensuring sensitivity to the endogenous neurotransmitter due to its competition on the same sites as the latter. To date, the majority of PET radiotracers are antagonist. This could explain the large number of failures to show their sensitivity to endogenous neurotransmitters. In this work, we show how the status of PET agonist radiotracer rethinks neuropharmacology through a review of the literature. In addition, preclinical experiments carried out with the new 5-HT_{1A} agonist radiotracer, [^{18}F]F13640, have shown unprecedented sensitivity to the release of serotonin, while its antagonist counterparts indicated contrasted results. These elements underline the importance of comparing the imagery of agonist and antagonist radiotracers. It also promotes the development of [^{18}F]F13640 and agonist radiotracers to add a functional approach to pharmacology in PET imaging.

Key Words: Neuropharmacology, 5-HT_{1A} receptors, Positron Emission Tomography, G Protein Coupled Receptors, Agonist

TABLE DES ABREVIATIONS

1TC : « one-tissue compartment »

2TC : « two-tissue compartment »

5-HT_{1A} : Récepteurs à sérotonine de sous-type 1_A

$5HT_{1B}$: Récepteurs à sérotonine de sous-type 1_B

5-HT_{2A} : Récepteurs à sérotonine de sous-type 2_A

ANSM : Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

$B_{max\ available}$: densité de récepteurs disponibles en fentomoles par milligrammes de préparation

B_{max} : Densité maximale de récepteurs en fentomoles par milligrammes de préparation

BP : « Binding Potential »

BPC : Bonnes Pratiques Cliniques

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

CAEC : Courrier de Demande d'Autorisation d'Essai Clinique

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CMP : « Good Manufacturing Practice »

CPP : Comité de Protection des Personnes

CT : Computed Tomography

D_1 : récepteurs dopaminergiques de type 1

D_2 : récepteurs dopaminergiques de type 2

D_3 : récepteurs dopaminergiques de type 3

DG : Déoxyglucose

DME : Dossier du Médicament Expérimental

EANM : « European Association of Nuclear Medicine»

EC_{50} : Concentration minimale provoquant 50% de l'effet

EMEA : « European Agency for the Evaluation of Medicinal Products »

FAEC : Formulaire d'Autorisation d'Essai Clinique

FDG : Fluorodéoxyglucose

GABA : Acide Gamma-Amino-Butyrique

HPCL : « High Performance Liquid Chromatography »

IC_{50} : Concentration minimale Inhibitrice de 50% de l'effet

ICH : « International Conference of Harmonization »

ICRP : « International Commission for Radiological Protection »

ICRP : « International Commission on Radiological Protection »

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISRS : Inhibiteur de Recapture Spécifique de Sérotonine

K_d : constante de dissociation du ligand en nanomoles par litre

K_i : Constante de dissociation du ligand à l'équilibre dans une expérience de déplacement

MA : Maladie d'Alzheimer

MCI : « Mild Cognitive Impairment », stade pécoce de la Maladie D'Alzheimer

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

NIMH : National Institute of Mental Health

nM : Nano Moles par Litre

PIPAME : Pôle Interministériel de Prospective et d'Anticipation des Mutations Economiques

pKa : logarithme négatif de la constance d'acidité

SIME : « Simultaneous Estimation »

SNC : Système Nerveux Central

SPECT : Tomographie par Emission Monophotonique

SRTM : « Simplified Reference Tissue Model »

TACs : Courbes Temps-Activité

TEP : Tomographie par Emission de Positons

V_S : Volume de distribution dans le compartiment spécifique

V_T : Volume de distribution dans le compartiment spécifique et non spécifique

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**

RESUME EN FRANÇAIS **5**

RÉSUMÉ EN ANGLAIS **6**

TABLE DES ABRÉVIATIONS **7**

TABLE DES FIGURES **12**

TABLE DES TABLEAUX **15**

INTRODUCTION GENERALE **16**

CHAPITRE 1 : GENERALITES **17**

I. HISTORIQUE DE L'IMAGERIE 17

II. IMAGERIE TEP 18

A. Principe *18*

B. Historique *19*

III. DEVELOPPEMENT DU RADIOTRACEUR TEP 21

A. Sélection de la question biomédicale *22*

B. Sélection de la cible biologique *23*

C. Synthèse chimique du radiotaceur *25*

D. Evaluation de la bibliothèque de radiotraceur *28*

E. Radiochimie pour la synthèse de radiotraceurs TEP *31*

F. Modélisation pharmacocinétique du radiotraceur *37*

G. Le passage à l'homme *43*

IV. QUELS SONT LES ROLES IDENTIFIES DES RADIOTRACEURS EN NEUROPHARMACOLOGIE ? 48

A. Concepts fondamentaux *49*

B. Quelle est la place de la TEP dans le développement du médicament ? *50*

C. Le cas de la phase 0 ou « PET microdosing » *54*

D. Le radiotraceur comme biomarqueur des pathologies neurologiques *56*

V. SYNTHESE 57

CHAPITRE 2 : LE MODELE LIGAND-RECEPTEUR EN PHARMACOLOGIE **59**

I. MODELE LIGAND-RECEPTEUR 59

II. CARACTERISTIQUES DE LA CIBLE D'UN LIGAND 60

III. NOTION D'AFFINITE, DE SPECIFICITE ET DE SELECTIVITE 61

IV. CARACTERISATION DE LA LIAISON SPECIFIQUE D'UN LIGAND 61

V. DEFINITIONS DE L'AGONISME ET DE L'ANTAGONISME 63

VI. CARACTERISATION DE L'EFFET DU LIGAND : NOTION DE PUISSANCE ET D'EFFICACITE 64

VII. LE CAS DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G 66

CHAPITRE 3 : PROBLEMATIQUE DE LA THESE 67

I. L'IMAGERIE TEP POUR MESURER LES FLUCTUATIONS DE NEUROTRANSMETTEUR ENDOGENE 67

II. LE BOULEVERSEMENT DU MODELE LIGAND-RECEPTEUR 68

A. Variabilité de réponse des radiotraceurs à la libération de neurotransmetteur 68

B. Notion d'effet plafond 69

C. La notion de retour à l'état basal partiel 72

D. Le cas de la spipérone et des récepteurs dopaminergiques D_1. 73

III. VERS L'EMERGENCE D'UN NOUVEAU MODELE PHARMACOLOGIQUE 73

CHAPITRE 4: LA PLACE DES AGONISTES TEP DANS LA NEUROIMAGERIE, REVUE DE LA LITTERATURE 74

I. INTRODUCTION 74

II. DISCUSSION 75

III. CONCLUSION 76

IV. ARTICLE 78

V. MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DE LA REVUE 103

CHAPITRE 5 : LE [^{18}F]F13640, UN NOUVEAU RADIOTRACEUR AGONISTE DES RECEPTEURS 5-HT_{1A} 113

I. VERS LE PREMIER RADIOTRACEUR AGONISTE 5-HT_{1A} 113

A. Pharmacologie des récepteurs 5-HT_{1A} 113

B. Les radiotraceurs 5-HT_{1A} 114

C. Développement des radiotraceurs agonistes 5-HT_{1A} 115

D. Radiotraceurs agonistes « de la série des F » 116

II. HISTOIRE THERAPEUTIQUE DU F13640 116

A. Propriétés analgésiques du F13640 ou béfiradol 116

B. Réorientation thérapeutique du F13640 ou NLX112 117

C. Développement du [^{18}F]F13640 117

III. ETAT DE L'ART DES DONNEES EXPERIMENTALES DES DONNEES DU [^{18}F]F13640 118

A. Données in vitro du [^{3}H]F13640 118

B. Preuve de la liaison du [^{18}F]F13640 aux récepteurs couplés 118

C. Expériences de compétition et de blocage 119

D. Utilisation du [^{18}F]F13640 dans la maladie d'Alzheimer 120

E. Sensibilité du [^{18}F]F13640 à la libération de sérotonine induite par fenfluramine 122

IV. CONCLUSION 122

CHAPITRE 6 : EVALUATION DE LA SENSIBILITE DU [^{18}F]F13640 A LA LIBERATION DE SEROTONINE 123

I. INTRODUCTION 123

A. Sélection de l'agent libérateur de sérotonine 123

B. Plan expérimental de l'étude 123

C. Justification du choix du temps d'administration de la fenfluramine 125

D. Justification de la sélection de la dose de fenfluramine 126

II. DISCUSSION 126
A. Modélisation du [^{18}F]F13640 127
B. Conséquences sur l'analyse de la sensibilité du [^{18}F]F13640 à la sérotonine 128
C. Impact de la cinétique du radiotraceur sur les mesures 129
D. Discordances des observations in vitro et in vivo 129
E. Apport de l'imagerie TEP différentielle agoniste/antagoniste 130
III. CONCLUSION 131
IV. ARTICLE 133

CHAPITRE 7 : PREMIER PASSAGE A L'HOMME DU [^{18}F]F13640 155
I. INTRODUCTION 155
II. MATERIEL ET METHODES 155
A. Sujets 155
B. Radiosynthèse 156
C. Contrôle qualité 157
D. Prélèvements artériels 158
E. Examens d'imagerie 160
F. Traitement des données 161
III. RESULTATS 161
A. Biodistribution 161
B. Images TEP et courbes temps-activité 162
C. Métabolites 164
D. Fonction d'entrée 165
E. Modélisation 166
IV. DISCUSSION 168
V. CONCLUSION 169
VI. ARTICLE 170

CHAPITRE 8 : PERSPECTIVES 172
I. WHAT IS CLUSTER HEADACHE? 173
II. HOW SEROTONIN (5-HT) IS IMPLICATED IN CH? 173
III. WHAT IS THE ROLE OF 5-HT$_{1A}$ RECEPTORS IN CH? 174
IV. HOW CAN PET/MR NEUROIMAGING HELP FOR UNDERSTANDING CH PATHOPHYSIOLOGY? 174
V. SPECIFIC AIMS 174
VI. METHODS 175
VII. EXPECTED RESULTS 175

CONCLUSIONS GENERALES 176
BIBLIOGRAPHIE 178
ANNEXE : TITRES ET TRAVAUX 201

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : récapitulatif de la réalisation d'un examen TEP. 19

Figure 2 : applications de la TEP en recherche fondamentale et en recherche clinique (10). 21

Figure 3 : représentation originale des étapes clés du développement d'un radiotraceur TEP selon un processus itératif (12). 22

Figure 4 : les différentes cibles biochimiques du radiotraceur (14). 23

Figure 5 : schéma des paramètres utilises en TEP. 26

Figure 6 : représentation schématique d'un cyclotron (29). 31

Figure 7 : les différentes voies d'obtentions des réactifs de marquage à partir du $^{11}CO_2$ (11). 32

Figure 8 : schéma réactionnel d'une substitution nucléophile directe. 33

Figure 9 : ligne de radiosynthèse du [^{18}F]F13640 mise au point au CERMEP, Lyon. 34

Figure 10 : étapes de normalisation des courbes cinétiques obtenues pour un radiotraceur cérebral (12). 36

Figure 11 : modèle de base de la modélisation échange ligand récepteur *in vivo* (36). 38

Figure 12 : modèle à 3 compartiments des interactions ligand-récepteur (38). 39

Figure 13 : équations différentielles obtenues pour le ligand marqué et non marqué (38). 39

Figure 14 : équation définissant la fonction d'entrée du modèle (38). 39

Figure 16 : équation d'occupation des récepteurs 49

Figure 17 : le rôle de l'imagerie TEP dans le développement du médicament (61). 51

Figure 18: rôle de l'imagerie TEP dans le développement du médicament et dans les études post-AMM (62). . 51

Figure 19: illustration de l'intérêt des études de « target occupancy » pour optimiser le développement du médicament (62). 52

Figure 20 : nouveau modèle de développement intégrant la phase 0 (67). 55

Figure 21 : positionnement de la phase 0 dans le développement du médicament. La phase 0 permet une économie significative d'animaux utilisés lors des phases précliniques (68). 56

Figure 22 : récapitulatif des changements synaptiques observés *in vivo* dans la Maladie d'Alzheimer et positionnements des explorations par imagerie TEP (69). 57

Figure 23 : les étapes du développement du radiotraceur. 58

Figure 24 : schéma illustrant le modèle simplifié ligand-récepteur(71). 59

Figure 25 : équation régissant le modèle ligand (L)-récepteur (R) (71). 59

Figure 26 : représentation de la liaison spécifique et non spécifique d'un ligand en fonction de sa concentration (71). 60

Figure 27 : courbe de saturation d'un ligand (71). 62

Figure 28 : représentation de Scatchard d'un ligand. B correspond à la concentration de ligand lié et f correspond à la concentration de ligand libre. B/f correspond au ratio de la concentration de ligand lie sur la concentration de ligand libre (71). 62

Figure 29 : équation modélisant l'interaction ligand(L)-récepteur(R)-(I)inhibiteur (71). 62

Figure 30 : équation reliant l'IC_{50} et le K_i du ligand teste (71). 63

Figure 31 : courbe effet-dose (71). 64

Figure 32 : effet d'un antagoniste compétitif sur la courbe effet-dose du ligand (d'après 73). 65

Figure 33 : effet d'un antagoniste non compétitif sur la courbe effet-dose du ligand (71). 65

Figure 34 : cycle d'activation des protéines G (73). 66

Figure 35 : modalités de liaison des radiotraceurs agonistes et antagonistes des protéines couplées aux Protéines G (92). 70

Figure 36 : ancien modèle et nouveau modèle proposés pour les récepteurs dopaminergiques. 71

Figure 37 : variations de liaison de trois radiotraceurs dopaminergiques en fonction de doses croissantes d'amphétamine (88). 71

Figure 38 : résumé de notre stratégie de recherche bibliographique. 74

Figure 39 : schéma récapitulant les modalités TEP existantes et leurs applications. Les zones en rouge identifient les rôles attribués aux radiotraceurs agonistes. 77

Figure 40 : comparaison des effets du découplage sur la liaison du [^{18}F]F13640 (agoniste) et le [^{18}F]MPPF (antagoniste) en autoradiographie *ex vivo* sur cerveau de rat (211). 118

Figure 41 : autoradiographie de lames de cerveaux de rats incubées avec le [18F]F13640 et des concentrations croissantes de WAY-100635 (n=3) et et de sérotonine (n=3). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique comparés au contrôle +/- sem (*p<0.05 ;** p<0.01 ;***p<0.001, versus control ; test annova suivi du test post hoc de dunnett's). Cing cx cingulate cortex, hip hippocampus (211). 119

Figure 42 : imagerie TEP contrôle du [^{18}F]F13640 chez le rat, le chat et le primate. Imagerie TEP du cerveau de rat avec co-injection de WAY-100635 (2 mg/kg) et pré-injection de 8-OH-DPAT (2 mg/kg) ; imagerie TEP du cerveau de chat avec pré-injection de WAY-100635 (2 mg/kg) et pré-injection de 8-OH-DPAT (1 mg/kg) (n=2) ; imagerie TEP du cerveau de primate avec pré-injection of WAY100635 (2 mg/kg). ; cinétique contrôle du radiotraceur chez le rat, avec co-injection et pré-injection associées (211). 120

Figure 43 : densité neuronale (revelée par immunocoloration neun), densité de recepteurs 5-HT_{1a} (selon la liaison du [^{18}F]MPPF) et densités de récepteurs fonctionnels (selon la liaison du [^{18}F]F13640) dans le gyrus dente et les zones CA1 de patients atteints de la Maladie d'Alzheimer à differents stades de Braak. Les résultats sont exprimés en pourcentage du groupe témoin (Braak stade 0). * p <0,05; ** p <0,01, test t non paramétrique de MANN-WHITNEY (216). 121

Figure 44 : comparaison des effets de l'administration de fenfluramine à des doses croissantes de fenfluramine sur la liaison du [^{18}F]F13640 et du |^{18}F]MPPF sur le cerveau de rat (n=3). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique comparés au contrôle +/- sem (*p<0.05 ;** p<0.01 ;***p<0.001, versus control ; test annova suivi du test post hoc de dunnett's). Cing cx cingulate cortex, hip hippocampus. 122

Figure 45 : plan expérimental de l'étude sur chat anesthésié. 124

Figure 46 : cinétiques des taux de sérotonine dans le cortex préfrontal -A : chez le rat,10 mg/kg, ip (223) ; B : chez le cochon, 0.5 mg/kg, iv (224) ; C : chez le singe conscient, 5mg/kg et 10 mg/kg, iv (225). 125

Figure 47 : fréquence cardiaque d'un chat après administration de fenfluramine 1 mg/kg a t=30 min. 126

Figure 48 : modèle triple injection applique sur le rat pour modélisation du [^{18}F]F13640. 127

Figure 49 : capture d'écran du logiciel pmod® (donnees non exploitées). La courbe bleue est la courbe temps activité modelisée du [^{18}F]F13640 dans la région caude putamen. Les points verts sont les points expérimentaux. 127

Figure 50 : imagerie TEP comparative du [^{18}F]F13640 et du [^{18}F]MPPF chez le chat. 130

Figure 51 : schéma du traitement des tubes après prélèvement. 159

Figure 52 : vue antérieure TEP corps entier du [^{18}F]F13640 des 3 sujets réalisée. 162

Figure 53 : image TEP statique [0-90]min d'un sujet. 163

Figure 54 : courbes temps-activité des 3 sujets (moyenne+/-sem). 163

Figure 55 : moyenne de radioactivité +/- sem des fractions d'élutions des échantillons plasmatiques au cours de l'acquisition. On notera 15 fractions d'élutions pour le patient 1 et 17 pour les 2 autres. 164

Figure 56 : fonction d'entrée plasmatique des 3 sujets. 165

Figure 57: summary of the experimental protocol and the questions we can answer through pet/mt imaging. 175

Table des tableaux

Tableau 1 : récapitulatif des règles de Lipinski (27). 27

Tableau 2 : propriétés *in vitro* prédictives de la réussite *in vivo* d'un radiotraceur (11). 30

Tableau 3: caractéristiques des radioisotopes majeurs utilisés pour la TEP du SNC (11). 32

Tableau 4 : les étapes que doit franchir un radiotraceur TEP pour devenir un radiopharmaceutique injectable à l'homme (11). 48

Tableau 5 : radioligands D_1 et D_2 et expériences TEP de compétition (86). 68

Tableau 6: recensement non exhaustif d'études TEP majeures abordant la sensibilité des radiotraceurs antagonistes 5-HT_{1a} à la libération de sérotonine. 132

Tableau 7 : liste des contrôles realisés sur le produit fini. 158

Tableau 8 : tableau récapitulant le schéma des prélèvements artériels. 158

Tableau 9: indices mesurés par le modèle 1TC. 166

Tableau 10: indices mesurés par le modèle Logan. 166

Tableau 11 : indices mesurés avec le modèle 2TC. 167

Tableau 12 : résumé des études [^{18}F]F13640 pour l'imagerie des récepteurs 5HT_{1a} couplés. 177

INTRODUCTION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse a été d'ouvrir de nouvelles applications pour la neuroimagerie grâce à un radiotraceur TEP des récepteurs à sérotonine de la famille 5-HT_{1A} identifié et développé au sein de l'équipe de recherche BIORAN. Le [^{18}F]F13640 est un agoniste très sélectif dont les propriétés radiopharmacologiques ont été explorées au niveau préclinique (modèle félin avec modulations pharmacologiques de la sérotonine extracellulaire) et qui a été mené jusqu'à sa première utilisation chez le volontaire sain, lui conférant le statut de radiopharmaceutique TEP.

Dans ce contexte, le premier chapitre a pour objectif de définir quelle est la place de la TEP en neuropharmacologie. Après un descriptif historique, il s'attardera sur les modalités de développement d'un radiotraceur TEP, étapes translationnelles cruciales.

Le second chapitre évoquera le modèle pharmacologique ligand-récepteur en neuropharmacologie.

Au vu de ces données bibliographiques, le troisième chapitre suivant formulera et développera la problématique de thèse.

Enfin, les chapitres suivants s'articuleront autour des résultats majeurs de cette thèse ayant donné lieu à des publications internationales : un article de revue bibliographique, un article résumant une expérience préclinique, une communication courte résumant une expérience clinique.

La thèse ouvrira ensuite la perspective d'un essai clinique utilisant le [^{18}F]F13640 pour l'exploration moléculaire et fonctionnelle d'une pathologie neurologique, l'algie vasculaire de la face.

CHAPITRE 1 : GENERALITES

I. Historique de l'imagerie

On peut attribuer les débuts de l'imagerie au XXème siècle, plus précisément en 1895 avec la mise en évidence des rayons X par Wilhelm Röntgen (1). En 1934, Fréderic et Irène Joliot Curie découvrent la radioactivité artificielle et la capacité de produire des molécules radioactives susceptibles de se fixer dans les organes du corps humain. Ces deux découvertes majeures sont à l'origine de deux pans de la radiologie : la radiologie conventionnelle, que l'on peut assimiler respectivement à une imagerie de transmission (tomographie puis scanner) et l'imagerie nucléaire que l'on peut assimiler à une imagerie d'émission (scintigraphie et tomographie par émission de positons). En radiologie conventionnelle, on utilise une source externe de rayons X, qui en contact avec la matière biologique, va subir un taux d'absorption variable : les tissus denses absorbent les rayons et n'impressionnent pas le support, les tissus peu denses n'absorbent pas les rayons et apparaissent en noir sur le support.

En radiologie nucléaire, on injecte un isotope radioactif, susceptible de produire un rayonnement gamma à l'intérieur du corps. Cette dernière technique donnera naissance dans un premier temps à la scintigraphie puis la TEP. L'objectif de la scintigraphie est d'obtenir une « photographie » d'un organe grâce à l'injection de molécules radioactives ayant une affinité pour celui-ci. La scintigraphie fonctionnelle conçue à l'institut Curie en 1956 sert à obtenir une image de la thyroïde après injection d'iode radioactif. Si la thyroïde est fonctionnelle, l'iode se fixe de façon homogène sur celle-ci et on obtient une image anatomique de la thyroïde. Dans un contexte pathologique, la thyroïde fixe de façon hétérogène l'iode et l'on obtient une image asymétrique de la thyroïde. En plus de la découverte de nouveaux isotopes, le développement de la scintigraphie suit aussi celui de la radiologie conventionnelle : il s'agit de construire des machines performantes ou caméras susceptibles d'automatiser et d'optimiser la capture du signal (rayons X ou rayons gamma) et son traitement informatique pour obtenir une image lisible en coupe et interprétable (résolution satisfaisante). Alors que le premier scanner utilisant les rayons X est inventé en 1972 par Hounsfield, le premier dispositif d'imagerie TEP apparaît en 1952 (2).

On cerne dès les débuts historiques de l'imagerie les piliers de son développement : l'imagerie apparaît comme un outil multimodal, elle permet d'explorer l'anatomie et la fonction des organes. Elle mobilise des scientifiques de cultures très différentes. Au-delà de la connaissance médicale nécessaire pour l'interprétation des images, l'imagerie rassemble aussi des informaticiens, des

ingénieurs, des pharmaciens, des biologistes, qui participent activement au processus de l'examen du patient, de l'animal, jusqu'à l'analyse de l'image. On comprend aussi que l'imagerie est alimentée par les sphères publiques et privées de la recherche. En effet, l'histoire de l'imagerie est rythmée par la conception de caméras commerciales de plus en plus performantes. L'industrie pharmaceutique développe aussi de potentiels candidats médicaments susceptibles d'être explorés via l'imagerie et de donner naissance à de nouveaux radiotraceurs. Aujourd'hui, les techniques d'imagerie ont une place majeure en recherche clinique et fondamentale. Elles sont peu invasives et permettent d'obtenir des informations cruciales sur le plan anatomique et sur le plan fonctionnel. Ceci est notifié dans le document publié par le Pôle Interministériel de Prospective et d'Anticipation des Mutations Economiques (PIPAME) intitulé « imagerie médicale du futur » (3). Dans ce document, le comité de pilotage fait le bilan des outils d'imagerie à disposition et évalue leur place d'un point de vue microéconomique. Elle évoque l'imagerie comme un pôle d'avenir à fort potentiel en évoquant l'intensification du développement d'une collaboration public/privé en recherche et développement

II. Imagerie TEP

A. Principe

La TEP est une technique d'imagerie nucléaire. Elle consiste à adjoindre à une molécule d'intérêt un atome radioactif émetteur de β+. Une fois injectées à doses traceuses, les particules β+ ou positons s'annihilent avec un électron pour émettre deux rayons gamma de sens opposés. Ces rayons sont captés par une caméra TEP. On obtient, après traitement, des images qui représentent l'intensité de radioactivité par région anatomique observée. Elle est utilisée à la fois en routine comme outil diagnostique (TEP au FDG) utilisé pour le diagnostic et le suivi de métastases et comme outil de recherche clinique et fondamentale notamment pour l'exploration moléculaire et fonctionnelle du cerveau. La TEP mobilise une grande variété de compétences (Figure 1), de la synthèse du radio-isotope jusqu'au traitement de l'image et son analyse par un personnel formé.

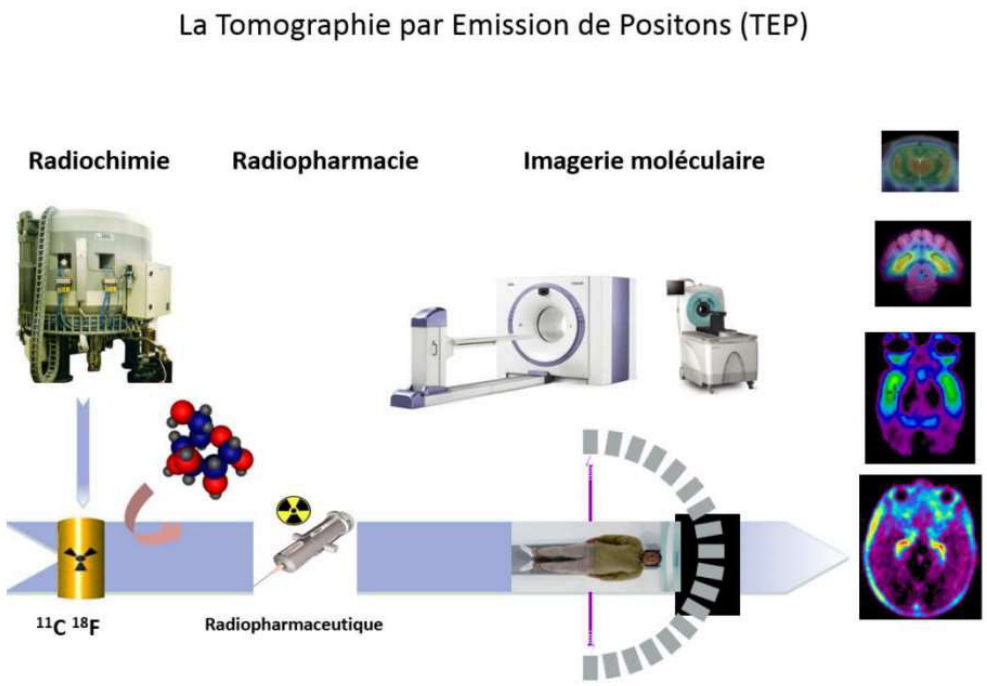


Figure 1 : récapitulatif de la réalisation d'un examen TEP.

B. Historique

Si l'on se focalise sur l'histoire de la TEP, on s'aperçoit qu'elle prend son essence dans un concept essentiellement physiologique décrit dans la fin des années 1800 (4). En 1878, Angelo Mosso évoque le concept que le flux sanguin cérébral est corrélé à la fonction cérébrale : il démontre, une augmentation des pulsations dans le cortex préfrontal droit lors de l'exécution d'une tâche arithmétique chez un sujet possédant une lacune de l'os du crâne. Cette découverte est confirmée ensuite par Charles Roy et Charles Sherrington qui évoquent un mécanisme intrinsèque induit par des composés chimiques à l'origine de la variation des calibres des vaisseaux et un apport sanguin variant en fonction de l'activité locale fonctionnelle d'une région cérébrale (5). Cette théorie, selon laquelle le flux sanguin est lié à la fonction cérébrale, est confirmée par les travaux de John Fulton (6) en 1928 et démontrée par les travaux de Seymour Kety en 1948 (7). Elle est à l'origine de l'interprétation des images obtenues par TEP. Les variations de distribution d'un radiotraceur métabolique entre les régions cérébrales visibles sur l'image sont dues à des modifications physiologiques locales de l'écosystème d'une région cérébrale et plus spécifiquement son flux sanguin. L'utilisation de radiotraceur pour calculer ce flux sanguin s'est rapidement avéré comme une technique efficace ouvrant l'opportunité de cartographier anatomiquement et fonctionnellement le cerveau. C'est la découverte, en 1934, de Irène et Frédéric Joliot-Curie citée

précédemment qui ouvre la possibilité de synthétiser des isotopes radioactifs sur mesure. L'adjonction de tels radioisotopes sur des molécules permet ainsi de produire les premiers radiotraceurs ayant la capacité d'explorer *in vitro* et *in vivo* les fonctions de l'organisme et, plus particulièrement, du cerveau avec une approche très sécuritaire pour le patient. L'utilisation de tels radiotraceurs constitue donc un outil de choix pour effectuer des mesures de flux sanguin cérébral. Les premières approches consistent à utiliser un radiotraceur pour mesurer sa répartition après un stimuli interne ou externe et en déduire les fonctions de chaque région cérébrale pour, en somme, cartographier le cerveau. Le premier radiotraceur est proposé par Louis Sokoloff (7). Il s'agit du déoxyglucose (DG), un inhibiteur compétitif réversible du glucose-6-phosphate, marqué au carbone-14. Ce marqueur permet, par son accumulation dans le cerveau, de mesurer l'utilisation du glucose par le cerveau et de cartographier l'anatomie et les fonctions cérébrales. En effet, lors d'une stimulation cérébrale locale, le flux sanguin augmente et la consommation de glucose par les cellules augmente. La carte d'activation obtenue par le [^{14}C]DG reflète l'activation fonctionnelle d'une région cérébrale. En 1976, il est proposé un radiotraceur similaire mais avec une demi-vie plus longue facilitant son utilisation, le [^{18}F]Fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG). Il constitue aujourd'hui le radiotraceur le plus utilisé pour cartographier le métabolisme cérébral. On notera qu'en 1983, l'équipe de Wagner propose le premier radiotraceur des récepteurs dopaminergiques chez l'homme, la 3-N-[^{11}C]methylspiperone (8). Cette découverte majeure ouvre les champs d'applications de l'imagerie TEP vers la neuropharmacologie : il est possible de visualiser *in vivo* une famille de récepteurs donnés. En parallèle avec le développement des premiers radiotraceurs, la conception de système d'imagerie connaît un essor notable. Benedict Cassen propose en 1950 la première machine détectant le signal émis par les radioisotopes, le 'scintiscanner' (9). S'en suivent quelques améliorations pour obtenir le 'photoscanner' développé par David Kuhl en 1956 (9). Ce dernier conçoit ensuite les premières machines Mark II, Mark III et Mark IV permettant d'effectuer les examens de tomographie par émission monophotonique. Les premiers appareils pour effectuer des examens TEP ont émergé dans les années 1950 avec les travaux de Gordon Brownell et de William Sweet (4). Les évolutions majeures de ces machines tendent vers l'obtention d'images en trois dimensions avec des reconstructions en coupes, l'amélioration de la résolution de l'image et la construction de machines hybrides TEP/CT et TEP/IRM. A partir des années 2000, la TEP s'impose, en marge de ses applications extra-cérébrales à vocation diagnostique, comme un outil indispensable de l'exploration physiologique et pathologique du cerveau. Elle devient un véritable outil translationnel en constituant un pont entre les études précliniques et cliniques et un pont entre la recherche clinique et la recherche fondamentale. L'une de ses premières applications est le diagnostic différentiel précoce des différents types de syndromes parkinsoniens via l'utilisation du FDG et un outil de sélection de candidats médicaments potentiels. La TEP permet en effet de visualiser des

états pathologiques avant même l'expression clinique des symptômes. Cet exemple illustre bien les quatre rôles majeurs qu'occupe aujourd'hui la TEP. Premièrement, elle permet de mettre en évidence et de comprendre les pathologies neurodégénératives par l'étude du flux sanguin cérébral et du métabolisme. Deuxièmement, elle propose d'éventuels biomarqueurs susceptibles de participer au diagnostic précoce de ces maladies. Troisièmement, l'utilisation de ces biomarqueurs peut constituer un outil intéressant pour développer des candidats médicaments. Quatrièmement, en recherche fondamentale, elle présente un intérêt particulier en neuropharmacologie puisqu'elle permet l'étude quantitative et qualitative des récepteurs cérébraux, selon le modèle ligand-récepteur, dont l'altération est impliquée dans les troubles neuropsychiatriques. Un schéma mettant en exergue l'aspect translationnel de la recherche en TEP est présenté ci-dessous :

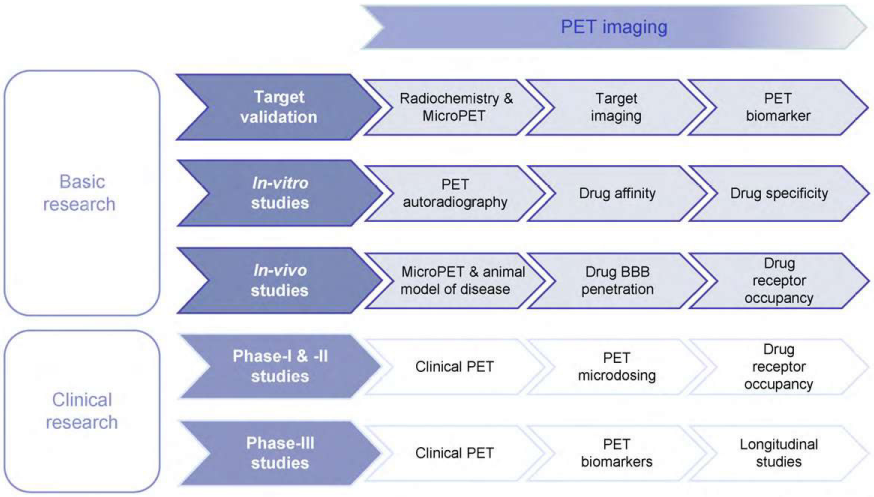


Figure 2 : applications de la TEP en recherche fondamentale et en recherche clinique (10).

III. Développement du radiotraceur TEP

Le développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP est décrit et formalisé par un grand nombre d'articles dans la littérature. La maturité acquise dans ce domaine a permis d'établir un « gold standard » définissant les différents points clés du développement. Cette partie s'appuie volontairement sur le contenu de deux revues récentes (11,12) de la littérature qui synthétisent les domaines abordés ici et sur l'expérience personnelle acquise pour le développement d'un radiotraceur, le [^{18}F]F13640. Les articles utilisés sont considérés comme pertinents et exhaustifs d'une part par le fait que les publications sont récentes et d'autre part parce qu'ils font la synthèse de plusieurs dizaines d'articles. Dans son article, Geneviève Van de Bittner expose de façon originale la manière de concevoir un radiotraceur en définissant une véritable philosophie du développement (12).L'imagerie TEP en neuropharmacologie est une technique bien caractérisée et les principes de cette philosophie ont fait l'objet de plusieurs travaux de synthèse antérieurs (13,14). Globalement, on peut assimiler son développement à celui du médicament. : Il s'agit d'un processus ambitieux,

long, coûteux et dont l'issue aboutit rarement à des résultats. C'est pourquoi parmi les milliers de cibles protéiques de l'organisme (récepteurs, transporteurs etc..) seulement 40 ont pu être imagées. Il est proposé cinq points clés pour optimiser ce processus (Figure 3). Ils seront donc développés un à un.

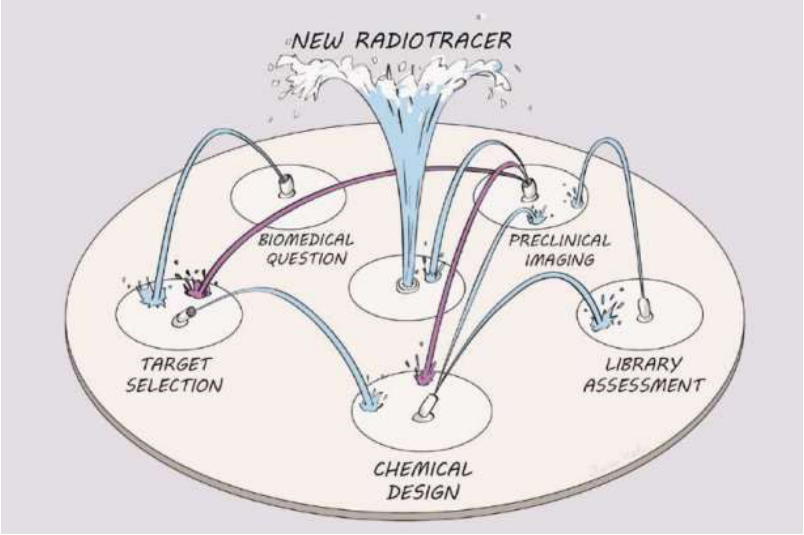


Figure 3 : représentation originale des étapes clés du développement d'un radiotraceur TEP selon un processus itératif (12).

A. Sélection de la question biomédicale

Le premier point clé évoqué est la sélection de la question biomédicale. L'auteur explique que tout développement de radiotraceur doit impérativement répondre à un besoin clinique pour mieux diagnostiquer ou pour améliorer l'arsenal thérapeutique d'une pathologie. Alors que le potentiel diagnostique d'un radiotraceur pour les pathologies du Système Nerveux Central (SNC) est faible, il faut plutôt considérer leur utilité pour établir chez l'homme une preuve de concept ou pour servir de compagnon dans le développement d'un médicament du SNC. Etant donné l'investissement énorme qu'implique un tel processus, la définition de la question biomédicale doit être complète et pertinente, de son apport scientifique et clinique, jusqu'à sa place dans le marché de la recherche. L'objectif final est le passage du radiotraceur dans le domaine de la routine clinique et cette notion s'applique particulièrement aux traceurs diagnostiques. Cet objectif est d'autant plus ambitieux que seulement quelques radiotraceurs (FDG, Florbetapir, Flutemetamol, [^{18}F]FNa, Florbetapen…) à visée diagnostique sont autorisés par la Food and Drug Administration (FDA), l'équivalent américain de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), depuis le début de l'imagerie TEP.

B. Sélection de la cible biologique

Le deuxième point évoque la sélection de la cible biologique pour répondre à la question biomédicale. Le choix d'une cible parmi tant d'autres est une épreuve cruciale de la stratégie du développement. La tâche s'avère toutefois plus aisée que celle de trouver un biomarqueur compagnon d'une pathologie puisqu'il s'agit de démontrer qu'une fonction, expression, occupation des récepteurs est altérée. Cette étape dépend aussi grandement, de la littérature qui existe à propos de la cible. Geneviève Van de Bittner définit 2 paramètres cruciaux pour définir la cible : sa fonction biochimique et sa localisation. Ces paramètres modulent la stratégie d'identification du radiotraceur et influencent l'information apportée par celui-ci. D'après la Figure 4, on peut définir trois types de cibles dans le SNC : les radiotraceurs se comportant comme des substrats d'enzyme (FDG) ou susceptibles d'inhiber une enzyme. Ces enzymes peuvent être intranucléaires ou intra cellulaires et les traceurs ne doivent pas influencer la mesure qu'ils mettent en évidence ; on trouve ensuite les radiotraceurs qui se lient aux agrégats de protéines situés dans le domaine extra cellulaire. Enfin la grande majorité des radiotraceurs ciblent les récepteurs cérébraux et c'est cette catégorie qui sera abordée exhaustivement dans ce mémoire. On notera par ailleurs que le prérequis commun à tous les traceurs du SNC est leur capacité à traverser la Barrière Hémato Encéphalique (BHE).

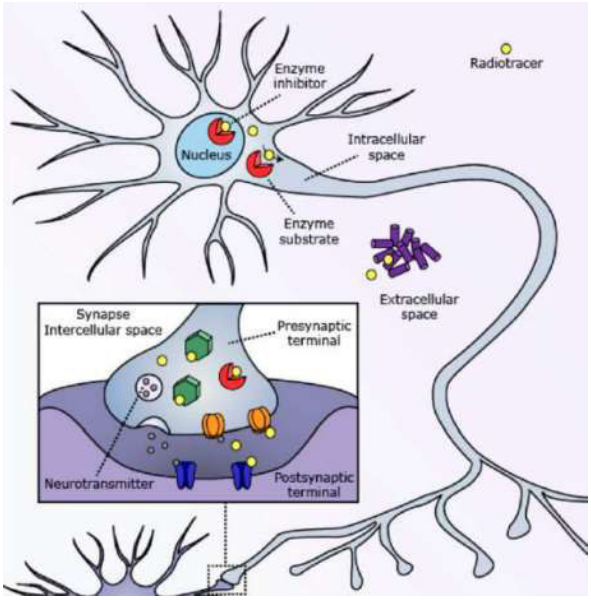


Figure 4 : les différentes cibles biochimiques du radiotraceur (14).

On explique cette proportion importante de cibles en réceptologie par le fait qu'un grand nombre d'agents thérapeutiques et de substances ciblent les récepteurs cérébraux. Les découvertes de la neuropharmacologie et de la neurotransmission ont été effectivement un moteur pour élaborer de

nouveaux radiotraceurs. Il faut noter que les récepteurs couplés aux protéines G font l'objet d'une attention toute particulière. En effet, la communauté internationale a bien caractérisé ces récepteurs et ils sont aujourd'hui la cible de toute les attentions autant pour le développement des radiotraceurs que pour le développement du médicament (15–17). Globalement, ces radiotraceurs se fixent sur les domaines inter cellulaires des récepteurs couplés aux protéines G, des transporteurs ou des canaux ioniques. Ils entrent en compétition directe ou indirecte, selon une modulation allostérique, avec les neurotransmetteurs du SNC (Dopamine, Noradrénaline, Histamine, Glutamate, GABA). L'analyse des images TEP permet d'obtenir des informations sur l'occupation des récepteurs, celles-ci étant toutefois dépendante du taux de ligand endogène : ce dernier est susceptible de perturber la densité des récepteurs (B_{max}). Par ailleurs, il est connu que le modèle ligand-récepteur fait intervenir des processus d'homopolymérisation et d'hétéropolymérisation, d'internalisation susceptibles d'interférer avec la mesure TEP et le calcul de l'affinité du radiotraceur (K_d) peut être biaisé. La compréhension de ces processus fait partie des défis actuels de la TEP. L'un des paramètres majeurs caractérisant les radiotraceurs est le potentiel de liaison ou « binding potential » (BP). Il correspond à l'expression du ratio de densité totale de cible biologique ou Bmax et de l'affinité de la cible exprimée en constante de dissociation ou K_d. L'expérience de l'usage des radiotraceurs fait penser qu'un ratio B_{max} sur K_d doit être au moins de 5 pour permettre une quantification de l'image TEP optimale (12). Toutefois cette règle peut être enfreinte dans certains cas. En dehors de la recherche, dans un contexte clinique, les radiotraceurs ont un BP de 10. Pour des traceurs non encore développés, on se base sur le B_{max} pour définir une affinité optimale. S'il est inconnu, le B_{max} est calculé par autoradiographie ou par des méthodes quantitatives immunochimiques. On notera par ailleurs que tous les radiotraceurs entrant en compétition avec des ligands endogènes, la densité de cibles maximales du radiotraceur ($B_{max\ available}$) correspond à la valeur de B_{max} ajustée sur le taux de cible occupée par le ligand endogène.

Le pourcentage d'occupation de la cible par le radiotraceur est d'une importance cruciale. Il doit être assez important pour dépasser les erreurs induites par la technique. C'est pourquoi on mesure souvent la variabilité intra sujet par une expérience de test-retest : un même sujet suit deux examens TEP identiques espacés de plusieurs jours. Selon les sources de l'auteur, cette variabilité pour les traceurs du SNC est comprise entre 5 et 15% (18,19). C'est pourquoi pour une étude longitudinale chez un sujet, les modifications de densité ou d'occupation des récepteurs doivent montrer un changement minimal de 15%. Pour les comparaisons de populations, les mesures sont soumises à une variabilité inter-sujet importante susceptible de bruiter les modifications de signal. Même si de grands changements peuvent être mis en évidence, les cliniciens préfèrent utiliser des critères binaires pour analyser l'image et établir un diagnostic ou un suivi thérapeutique.

Enfin, un autre élément essentiel pour la sélection de la cible est la nécessité de travailler sur des petites molécules de haute affinité avec une relation structure activité bien établie, idéalement issue d'un développement de médicament. Pour les nouvelles cibles sans « background » dans la littérature, il sera nécessaire d'établir une population de molécules à « screener ». Etant donné le coup du développement de traceurs de novo, il faut s'assurer que la cible possède les prérequis nécessaires pour l'imagerie TEP du SNC à savoir un B_{max} haut avec des changements de densité ou d'occupation fortement corrélés avec la question biomédicale.

C. Synthèse chimique du radiotaceur

L'ensemble des candidats radiotraceurs est soit dérivé d'un ligand connu de la cible d'intérêt ou issu d'un screening intensif. Instinctivement, il apparaît que l'usage de ligands ou de molécules thérapeutiques préexistants est aisé. Toutefois l'auteur reporte par l'expérience de son propre laboratoire l'existence de plusieurs facteurs à l'origine de l'échec de cette stratégie (12). Premièrement, l'injection d'une faible masse de radiotraceur requiert un ratio cerveau/plasma très haut (20). Deuxièmement, la liaison non spécifique du radiotraceur est responsable de nombreux échecs (21–23). Troisièmement, une cinétique d'élimination trop lente ou trop rapide ne permet pas de réaliser une imagerie TEP (24). Il est important de considérer que les deux derniers facteurs péjoratifs cités ci-dessus sont des facteurs de sélection pendant le développement thérapeutique pour maintenir une action sur la cible après une administration unique. Le développement thérapeutique ne va pas toujours dans le sens du développement TEP du radiotraceur correspondant. Il faut donc classer les radiotraceurs candidats selon des contraintes biochimiques et physiologiques pour basculer directement vers les étapes ultérieures (validation du traceur et études précliniques).

On réalise donc qu'un bon médicament ne fait pas forcément un bon radiotraceur. En effet l'angle pharmacométrique des deux composés est différent. La pharmacométrie du médicament prend en compte trois paramètres que l'on peut considérer comme trois dimensions (Figure 5) : l'effet, la dose et le temps. Pour développer un médicament, on recherche une dose qui produit un effet maximum pour une dose donnée et qui perdure dans le temps après administration unique. Pour développer un radiotraceur, on utilise une microdose sans effet qui possède une cinétique d'entrée et de sortie rapides. Simon M. Ametamey, Michael Honer, et Pius August Schubiger, scientifiques du département des sciences radiopharmaceutiques de l'institut fédéral technologique de Zurich, décrivent un exemple illustratif de cette non correspondance médicament-radiotraceur en évoquant

le cas de la fluoxétine. Cet antidépresseur testé comme radiotraceur des transporteurs de sérotonine a montré des performances faibles à cause de sa liaison non spécifique importante *in vivo* (25).

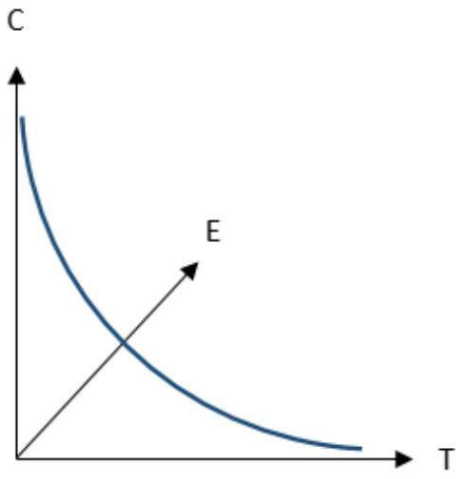


Figure 5 : schéma des paramètres utilisés en TEP.

La pharmacométrie utilise trois paramètres qui sont la concentration de ligand(C), l'effet de celui-ci (E) et le temps (T). La courbe bleue représente la cinétique plasmatique d'un radiotraceur TEP. En TEP, le ligand ne produit aucun effet parce qu'il est injecté à microdoses. On obtient donc une courbe à 2 dimensions. Les prérequis du développement du médicament ne vont pas forcément dans le sens de ceux du radiotraceur

Pour la synthèse de novo de radiotraceurs du SNC, la probabilité de trouver des composés de haute affinité, traversant la BHE peut être augmentée en mettant en concurrence plusieurs radioligands, issus chacun de strates chimiques différentes. De plus, les groupes chimiques qui offrent des sites aisément substituables avec divers groupes fonctionnels doivent être testés. Ces deux éléments sont essentiels pour la composition d'une bibliothèque de potentiels radiotraceurs. Il est à noter que de simples changements tels que l'addition d'un méthyl peut changer de façon drastique les propriétés du radiotraceur.

Le site de marquage doit être similaire pour tous les radiotraceurs de façon à effectuer une synthèse haut débit de tous les radiotraceurs dérivés. Le marquage peut toutefois utiliser des méthodes de radiosynthèse légèrement différentes. La méthylation au carbone-11 est la méthode souvent utilisée de par sa nature simple et sa tolérabilité vis-à-vis des autres groupes fonctionnels. Il est possible d'apposer un fluor-18 à un radiotraceur habituellement marqué au carbone-11 pour envisager une transition clinique dans des centres ne possédant pas de cyclotron. En effet, la demi-vie du fluor-18 est de 110 min contre 20 min pour le carbone-11. La contrainte temporelle imposée par la demi-vie courte du carbone-11 impose sa production sur le site clinique. Des synthèses à haut débit reportent

des [^{18}F]fluoroalkylations sur des bibliothèques de radiotraceurs mais ce processus n'est présent pour aucun radiotraceur du SNC. Il existe en effet un nombre limité de méthodes de radiomarquage au fluor-18. La découverte de nouvelles voies de marquage au fluor-18 est donc un enjeu majeur.

Il est important de considérer les contraintes physiologiques imposées aux structures chimiques des candidats radiotraceurs. Pour maintenir une concentration plasmatique après injection intraveineuse, les radiotraceurs doivent être biodisponibles. Ils doivent suivre le plus souvent la « règle des cinq » énoncée par Lipinski (26). Ce chimiste de l'industrie pharmaceutique formula en 2001 une série de propriétés moléculaires s'appliquant aux molécules chimiques en développement pour obtenir des composés biodisponibles par voie orale et donc susceptibles de devenir des médicaments. La première règle impose un nombre inférieur ou égal à cinq donneurs d'hydrogène. La deuxième impose un nombre inférieur ou égal à 10 d'accepteurs d'hydrogène. La troisième impose une masse moléculaire inférieure à 500 daltons. La dernière impose un coefficient de partition octanol-eau inférieur ou égal à 5. On l'appelle la règle des 5 car chaque propriété énoncée contient un multiple de 5.

Nombre de donneurs d'hydrogène	≤5
Nombre d'accepteurs d'hydrogène	≤10
Masse moléculaire	≤500 Daltons
Coefficient de partition octanol-eau	≤5

Tableau 1 : récapitulatif des règles de Lipinski (27).

En plus de leur biodisponibilité, ils doivent franchir la BHE et cette propriété cause l'échec de nombreuses tentatives de développement. La BHE limite l'entrée dans le cerveau uniquement aux radiotraceurs qui pénètrent par diffusion passive. Par ailleurs, les radiotraceurs doivent avoir une liaison non spécifique ou liaison non saturable faible. D'autres propriétés chimiques telles que log P, log D, la masse moléculaire ou le pKa peuvent être corrélées au comportement du radiotraceur *in vivo* mais ne sont pas forcément prédictives. Des méthodes de prédictions utilisant des logiciels informatiques sont en développement et peuvent apporter des informations utiles pour déterminer le radiotraceur à tester en priorité. L'objectif est de relier une propriété

pharmacologique/pharmacocinétique attendue (le passage de la BHE, par exemple) à un groupement chimique donné. Le radiotraceur qui répond le plus aux contraintes chimiques déterminées doit être testé en premier. Toutefois, de nombreux progrès sont attendus pour cette méthode.

Un dernier point à considérer dans ce sous-chapitre est la carte du métabolisme des traceurs. En effet, ceux-ci sont pour la plupart intensément métabolisés (ou dénaturés) par les enzymes de l'organisme. Ce phénomène modifie la structure des radiotraceurs. Les métabolites produits peuvent avoir une cible différente de la molécule parente et impacter sur le signal cérébral mesuré : le signal obtenu serait le signal d'un ou plusieurs métabolites liés à une autre cible plus celui du composé parent. Ainsi, l'investigateur se doit d'évaluer la part de signal expliquée par les métabolites. L'auteur cite par exemple la déméthylation des hétéroatomes méthylés au carbone-11 en périphérie (12). Ce phénomène peut libérer du [^{11}C]formaldéhyde, du [^{11}C]formate et du ^{11}CO2. La défluorination des radiotraceurs peut résulter en la production d'ions fluorures qui s'accumulent dans les os du crâne provoquant une chute du signal dans le cerveau. Enfin, le métabolisme est très dépendant des espèces et pose donc un problème de comparaison des résultats inter-espèces en recherche translationnelle. L'auteur explique par exemple que les rats ne possèdent pas de vésicule biliaire. Cette différence avec l'homme suggère que la pharmacocinétique d'un même radiotraceur peut être très différente. Par conséquent, il serait une erreur d'écarter un radiotraceur sous prétexte qu'il montre peu de potentiel chez le rat. Il est plus pertinent d'envisager rapidement une transition vers le primate susceptible de donner des informations pharmacocinétiques prédictives du comportement du radiotraceur chez l'homme.

D. Evaluation de la bibliothèque de radiotraceur

L'objectif suivant est de sélectionner « les composés actifs de base » ou « lead compound », de les radiomarquer et de le tester en imagerie préclinique. A nouveau, cette étape est proche de celle que l'on peut décrire pour développer un médicament. On détermine son affinité, sa sélectivité et les propriétés de liaison qu'il entretient avec la cible. La mauvaise pharmacocinétique et le haut taux de liaison non spécifique demeurent les facteurs responsables du haut taux d'attrition des candidats radiotraceurs à l'étape de l'imagerie préclinique. Aujourd'hui il n'y a d'ailleurs aucun moyen de prédire ces facteurs. Il faut donc apprécier cette étape non comme un processus linéaire d'évaluation mais comme un processus itératif. Tout échec d'évaluation fait retourner à l'évaluation *in vitro* d'un autre radiotraceur. On rappelle que l'ensemble de l'évaluation effectuée à ce stade fait appel à des techniques *in vitro* et ex vivo. L'ensemble des éléments sont décrits dans le tableau suivant.

On notera que les souris « Knock-out » ou KO sont un outil intéressant pour déterminer la cible du radiotraceur. En effet, il est possible de créer des lignées de souris dépourvues d'une cible donnée. L'absence de signal TEP pour un radiotraceur chez ce type de lignée est une preuve formelle de sa spécificité d'action (27). Dans le cas où l'on classe les molécules avant de les radiomarquer, on mesure et on compare les affinités qui doivent se ranger de l'échelle nanomolaire jusqu'à l'échelle subnanomolaire selon la densité des cibles. La nature de cette mesure est hautement dépendante de la fonction biochimique de la cible : mesure de déplacement d'un ligand, perturbation d'une interaction protéine-protéine, formation d'adduits covalents, et inhibition de la catalyse d'une enzyme. Pour optimiser ces essais de mesure d'affinité, il est important d'utiliser un contrôle positif ou de le développer en même temps que la bibliothèque de radiotraceurs (12). Il est important de développer les traceurs pour lesquels la constante de dissociation est rapide surtout ceux dont la demi-vie est courte. Cette propriété cinétique doit être prioritaire sur l'affinité intrinsèque du radiotraceur. Par ailleurs, il est important de rappeler que les essais *in vitro* peuvent montrer une grande variabilité test-retest et peuvent ne pas refléter les propriétés *in vivo* de la cible. Il s'agit plus de regrouper les radiotraceurs potentiels que de les classer simplement par ordre de valeur d'affinité calculée *in vitro*.

Les candidats radiotraceurs peuvent éventuellement se lier à des cibles dites « off-target » qui sont structurellement ou fonctionnellement apparentées à la cible utilisée pour l'imagerie. Il s'agit ici d'une liaison non sélective à différencier de la liaison non spécifique évoquée précédemment. La sélectivité pour un radiotraceur dépend des densités relatives de la cible secondaires par rapport à la cible première et des taux relatifs de liaison. La sélectivité moyenne ne constitue pas un obstacle si la distribution régionale de la cible secondaire possède un léger chevauchement anatomique avec la cible primaire. Si les radiotraceurs peuvent donc avoir une liaison non sélective basée sur une homologie de structure des cibles, ceux-ci peuvent aussi avoir des liaisons non sélectives sur des cibles non prédictibles. Ce type de cibles peut être identifié éventuellement par des programmes de screening massifs tels que le « NIMH psychoactive drug screening programm » (12). Même si l'on doit théoriquement éliminer les traceurs à liaisons non sélectives *in vitro*, certains peuvent faire preuve d'une bonne sélectivité *in vivo* et notamment ceux pour lesquels la densité de cible (B_{max}) est élevée par rapport aux autres cibles ou ceux dont la répartition régionale de la cible d'intérêt ne chevauche pas celle de la cible non sélective.

L'analyse biochimique des tissus cérébraux permet de pallier l'écart obtenu entre les données *in vitro* et l'imagerie préclinique. Les méthodes d'autoradiographie permettent une mesure facile de la dissociation ou de l'association à la cible et les protocoles sans lavage sont prédictifs de la liaison non

spécifique *in vivo*. Cependant, ces expériences requièrent un radiomarquage et ne sont pas utiles pour le screening prospectif. Si les candidats radiotraceurs sont disponibles dans le commerce, il est conseillé avant toute radiosynthèse ou radiomarquage de recueillir les données pharmacocinétiques. De nouvelles méthodes utilisant la spectrométrie de masse permettent d'obtenir des informations de distribution du composé non marqué dans le cerveau pour les comparer aux niveaux d'expression de la protéine cible. Elles permettent aussi l'analyse de la liaison spécifique et non spécifique du composé dans les différentes régions cérébrales. Cependant ces analyses avec des composés non marqués empêchent les mesures de capture et de liaison des métabolites et de gros efforts doivent être faits pour obtenir des données pharmacocinétiques complètes. En effet, dans ce cas, chaque animal ne donne qu'une photographie à un temps t de la répartition du traceur non marqué. Ceci contraste avec l'imagerie préclinique, une imagerie dynamique, qui permet, pour une injection, d'obtenir le suivi des métabolites à partir de prélèvements sanguins et les données pharmacocinétiques complètes du radiotraceur. Dans son article, Michael Honer, en charge du pôle d'imagerie du petit animal de l'institut technologique fédéral de Zurich, définit dans un tableau l'ensemble des propriétés physicochimique qu'un radiotraceur doit posséder pour prédire une bonne performance *in vivo* (11).

Proposed physicochemical and pharmacological characteristics predictive of good *in vivo* performance

Property		Desirable range
Affinity expressed as dissociation/inhibition constant	K_d/K_i	<10 nM
Binding site density to affinity ratio	B_{max}:K_d	>10
Lipophilicity	log D[c]	$1.0 \leq \log D \leq 3.0$
Molecular weight	MW	≤500 mol/g
Topological polar surface area	TPSA	≤75 Å
Number of hydrogen bond donors	HBD	<1
P-glycoprotein-mediated efflux	P-gp	No active efflux
Passive membrane permeability	PAMPA P_{eff}[d]	$\geq 2 \times 10^{-6}$ cm s^{-1}
Clearance		Medium-to-high
Unbound ligand fraction in the brain[a]	Fu_b	≥15%
Unbound ligand fraction in plasma[b]	Fu_p	≥10%

[a] Fu_b corresponds to the free fraction f_{ND} in the nondisplaceable compartment as used in the imaging nomenclature [29].
[b] Fu_p corresponds to the free fraction f_P in the plasma as used in the imaging nomenclature.
[c] log D, octanol/water distribution coefficient.
[d] PAMPA P_{eff}, passive artificial membrane permeability as assessed in the PAMPA assay [24].

Tableau 2 : propriétés in vitro prédictives de la réussite in vivo d'un radiotraceur (11).

On notera qu'il est suggéré que le radiotraceur doit avoir une clairance moyenne à rapide. Cette élimination doit permettre en effet de limiter la liaison non spécifique du radiotraceur. Par ailleurs, une faible liaison aux protéines plasmatique est désirable pour permettre l'entrée du radiotraceur dans la zone cérébrale. En effet, seul le plasma (sang dépourvu des protéines) traverse la BHE.

E. Radiochimie pour la synthèse de radiotraceurs TEP

La radiochimie est un domaine qui occupe une place majeure dans le développement de radiotraceurs TEP (11,28). Elle vise à synthétiser le radiotraceur de la façon la plus optimale possible : La synthèse doit être rapide (synthèse et purification ne doivent pas excéder 2 à 3 fois la demi-vie du radioisotope), automatisée et son rendement doit être important. Globalement, elle rassemble la production d'un radionucléide à l'aide d'un cyclotron, la réaction de marquage du précurseur, l'évaluation analytique du produit fini et la production du radiopharmaceutique. La synthèse de nouveaux radiotraceurs capables de se lier à de nouvelles cibles dans le SNC est grandement dépendante de la capacité des radiochimistes à marquer de petites molécules de haute activité spécifique. Ces caractéristiques permettront ensuite d'injecter des doses de l'ordre du microgramme (dose traceuse) émettant suffisamment de signal pour obtenir une image TEP avec une résolution satisfaisante. On abordera ici uniquement les techniques de radiochimie visant à synthétiser des radiotraceurs du SNC. En effet, il existe un grand nombre de radioisotopes disponibles. Ceux qui sont majoritairement utilisés pour la TEP du SNC sont le carbone-11 et le fluor-18.

La première étape est la production des radioisotopes à l'aide d'un cyclotron. Classiquement, le cyclotron accélère des particules qui heurtent une cible liquide ou gazeuse contenant de l'oxygène-18 sous forme d'eau enrichie ou de l'azote-14 sous forme gazeuse (Figure 6).

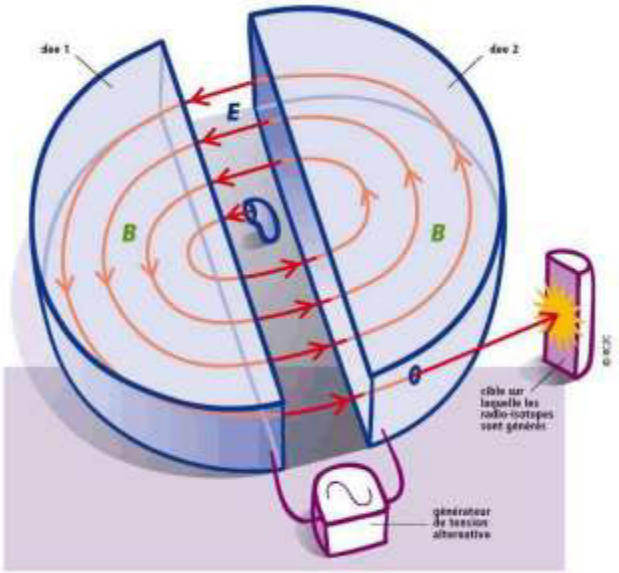


Figure 6 : représentation schématique d'un cyclotron (29).

On obtient alors respectivement du fluor-18 et du carbone-11 qui constituent les radioisotopes les plus utilisés en TEP. De la synthèse des radioisotopes suit la formation du précurseur pour la réaction de marquage. Le précurseur peut être formé in situ (dans la cible) ou après extraction du

radioisotope de la cible. Les caractéristiques des deux isotopes les plus couramment utilisés sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

Characteristics of carbon-11 and fluorine-18 isotopes

Nuclide	Half-life (min)	Max. energy (MeV)	Chemical form produced by cyclotron	Specific activity (in GBq/μmol)		Isotopic dilution effect
				Theoretical max.	Practical value at time of QC (from CO_2 for carbon-11)	
Carbon-11	20.4	0.96	CO_2, CH_4	3.24×10^5	$1.0–5.0 \times 10^2$	1000
Fluorine-18	109.8	0.69	Fluoride ion	6.3×10^4	$2.0–3.0 \times 10^2$	100

Abbreviations: min, minutes; MeV, Mega electron volt; GBq/μmol, Giga Becquerel per micromole; QC, quality control.

Tableau 3: caractéristiques des radioisotopes majeurs utilisés pour la TEP du SNC (11).

1. Radiochimie du carbone-11

Il existe une multitude de réactions nucléaires pour produire du carbone-11 (11,25). La méthode usuelle est le bombardement d'une cible gazeuse d'azote avec des protons. Un grand nombre d'agents réactifs marqués au carbone-11 existe mais tous n'ont pas le même spectre d'application. La plupart peut être obtenue directement dans la cible ou via une réaction chimique utilisant le ^{11}CH4 ou le ^{11}CO2. L'addition d'hydrogène dans la cible donne du 11CH4 et l'addition d'oxygène donne du ^{11}CO2. Le ^{11}CO2 reste aujourd'hui le réactif de marquage le plus polyvalent (Figure 7].

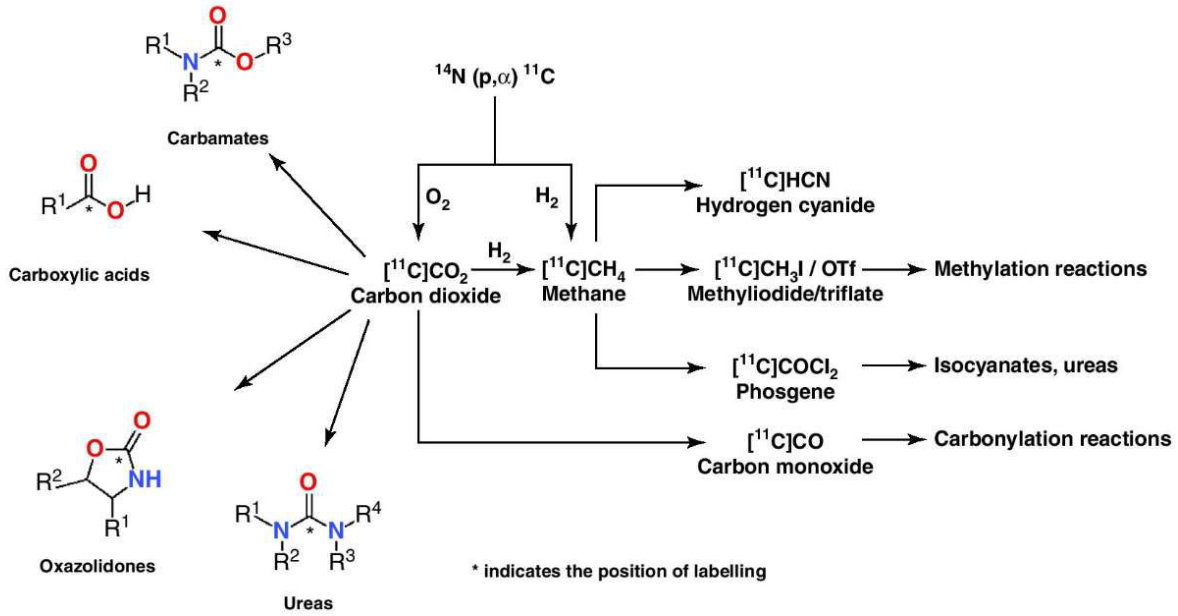


Figure 7 : les différentes voies d'obtentions des réactifs de marquage à partir du ^{11}CO2 (11).

2. Radiochimie du fluor 18

Le fluor-18 est le radioisotope le plus désirable en imagerie TEP (11). En effet, sa demi-vie de 110 min (contre 20 min pour le carbone-11) autorise la réalisation de synthèse multi-étapes, des examens TEP plus longs. Ceci est particulièrement utile dans le cas des radiotraceurs à demi-vie

pharmacocinétique longue et une utilisation dans des centres dépourvus de cyclotrons. Il existe différentes réactions pour la production de fluor-18. Différentes cibles sont utilisées en fonction de la forme d'agents réactifs que l'on veut obtenir à savoir la forme électrophile et la forme nucléophile(25).

Les substitutions nucléophiles aliphatiques et aromatiques directes (Figure 8) sont les plus utilisées. Pour le cas du marquage de protéines, l'objectif est de préparer un précurseur possédant 2 blocs fonctionnels reliés par un « linker » : Un bloc permet la substitution nucléophile du fluor-18 et un bloc permet la fixation sur la cible.

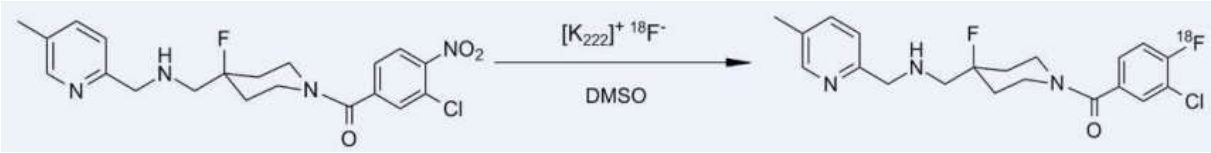


Figure 8 : schéma réactionnel d'une substitution nucléophile directe.

Ces deux types d'approche permettent le marquage de molécules de toutes tailles. On notera cependant que les grosses molécules utilisées en TEP sont majoritairement des protéines. Etant donné leur demi-vie pharmacocinétique longue dans l'organisme susceptible de provoquer une exposition radioactive importante, elles sont plutôt radiomarquées avec des métaux radioactifs.

L'usage de réactions de substitutions électrophiles est moins répandu. En effet, les activités spécifiques obtenues avec ce type de réactions sont basses. Toutefois, Michael Honer cite une méthode récente qui a montré la possibilité de synthétiser un agent électrophile avec une haute activité spécifique (30).

3. Le concept de « click-chemistry »

Ce concept récent consiste à combiner la spécificité d'action d'un anticorps et la synthèse de radiotraceurs TEP (11). En résumé, il s'agit d'injecter un anticorps possédant un groupe chimique spécifique préparé pour accueillir, une fois que l'anticorps a atteint sa cible, une molécule radiomarquée. Lors de la rencontre des deux éléments, une réaction dite de « click chemistry », permet la liaison covalente des deux éléments. Aujourd'hui, il s'agit de développer ce type d'approche en neurologie. Le défi majeur étant de trouver des anticorps susceptibles de passer la BHE.

4. Procédé de synthèse

Comme cité précédemment, il est nécessaire d'automatiser les synthèses de radioisotopes. Ceci permet d'assurer une reproductibilité de la synthèse et un contrôle des paramètres critiques de la radiosynthèse (activité spécifique, rendement de la réaction…). A titre d'exemple, le schéma ci-dessous représente le dispositif de synthèse du radiotraceur [^{18}F]F13640.

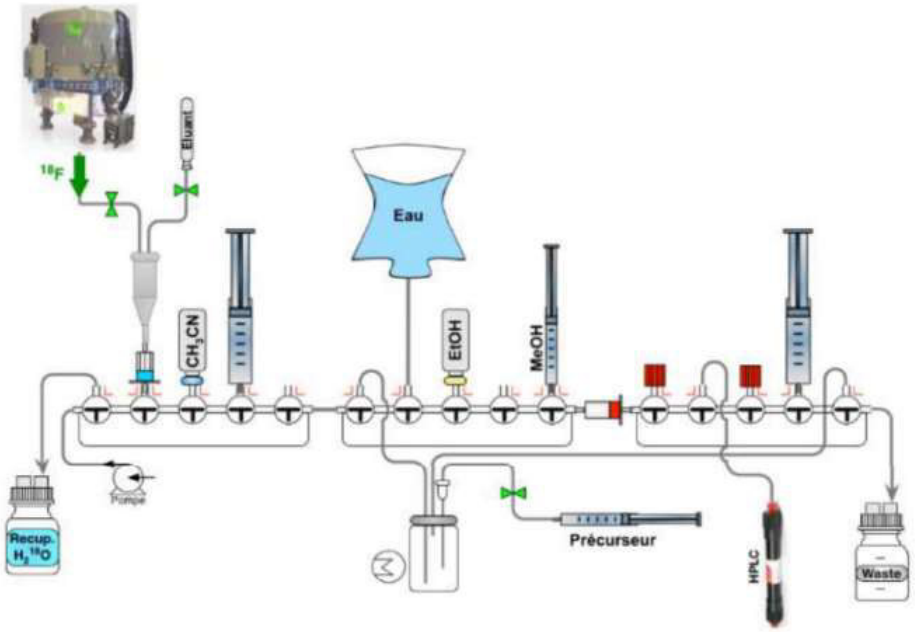


Figure 9 : ligne de radiosynthèse du [^{18}F]F13640 mise au point au CERMEP, Lyon.

5. Contrôle qualité du produit fini

Le produit fini issu de la synthèse est analysé par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) couplée avec un détecteur de radioactivité. Ce contrôle de sécurité permet de déterminer l'activité spécifique de la radiosynthèse, l'identification du produit fini et sa pureté. Une fois contrôlé, le produit est conditionné dans une seringue et formulé de sorte que la radioactivité corresponde à celle imposée par le protocole.

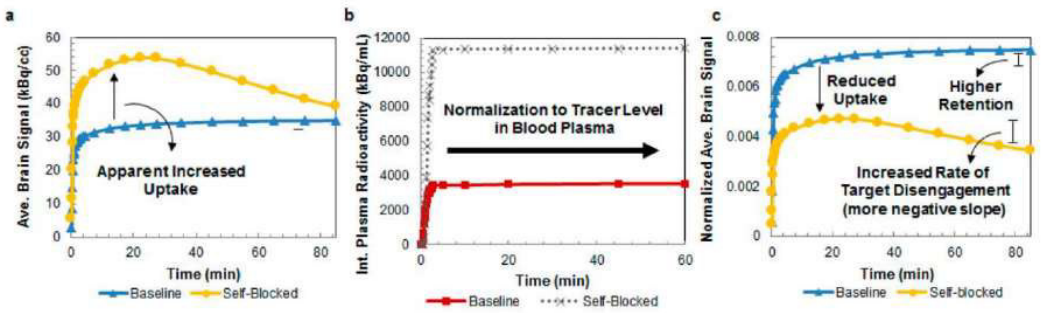
6. Imagerie préclinique du radiotraceur

L'imagerie TEP préclinique est bien décrite dans la littérature. Elle fait appel à diverses techniques qui sont à adapter selon le modèle animal utilisé (14). En effet, les paramètres d'acquisition de la caméra, le temps d'acquisition, la dose injectée varient selon la taille de l'animal.

Dans son article, Geneviève Van de Bittner explique que l'évaluation la plus effective en terme de temps pour évaluer un radiotraceur du SNC est de passer directement au radiomarquage et à l'évaluation préclinique du radiotraceur en négligeant l'étape d'évaluation biochimique (12). Ceci permet une analyse et une comparaison directes de la cinétique du radiotraceur et de sa liaison sur sa cible *in vivo* (« target engagement »). Ce passage direct à l'évaluation *in vivo* permet d'éviter d'écarter de potentiels radiotraceurs possédant des propriétés *in vitro* peu attrayantes à savoir une faible liaison spécifique et une faible sélectivité.

La première étape consiste à vérifier la pénétration cérébrale du radiotraceur. Pour cela, on représente à partir des courbes-temps-activité ou TACs, le pourcentage de dose injectée dans le cerveau entier ou dans la région cérébrale riche en cible (%ID/cc) en fonction du temps. Selon les règles de laboratoire, les radiotraceurs avec un pourcentage d'ID/cc au-delà de 0.1% chez le rat et au-delà de 0.01% chez le primate dans les 5 min post-injection, ont une pénétration satisfaisante de la BHE (12).

Quand un candidat radiotraceur démontre une bonne pénétration de la BHE, la deuxième étape consiste à prouver la spécificité de la liaison sur la cible cérébrale via des études de blocage homologue. Les animaux sont prétraités avec le composé non marqué équivalent au radiotraceur, avant l'injection de celui-ci. Si le composé non marqué entre en compétition avec la liaison du radiotraceur, le signal obtenu sur l'image sera réduit, indiquant une liaison spécifique. L'analyse de ces données doit être faite avec précaution parce que le blocage des sites de liaison du radiotraceur par son équivalent non radiomarqué augmente la fraction libre du radiotraceur dans le plasma et donc le signal TEP par rapport à celui obtenu chez les animaux contrôles. Cet effet doit être pris en compte en normalisant l'absorption du radiotraceur et en corrigeant le signal propre au radiotraceur de celui obtenu par ses métabolites. Ces étapes, résumées dans la Figure 10, constituent le prérequis nécessaire pour effectuer une modélisation de la pharmacocinétique du radiotraceur pertinente.



Impact of normalization of brain radiotracer signal to plasma radiotracer level. (A) Non-normalized baseline (blue) and self-blocked (yellow) brain signals for martinostat. (B) Integrated martinostat radioactivity in plasma during baseline (red) and self-blocked (gray) PET scans. (C) Plasma-normalized baseline (blue) and self-blocked (yellow) brain signals for martinostat.

Figure 10 : étapes de normalisation des courbes cinétiques obtenues pour un radiotraceur cérébral (12).

On doit ensuite évaluer que le radiotraceur est effectivement bien lié à sa cible parce qu'il est possible que ses métabolites se lient à d'autres cibles. Ces études sont nommées « on-target specific binding ». Cette vérification s'effectue par des études de blocage hétérologue. Autrement dit, on prétraite les animaux avec plusieurs composés de structure différente du radiotraceur et connus pour se fixer sur la même cible. Comme dans l'étape précédente, on s'attend à obtenir une diminution des aires sous les courbes des TAC. L'autoradiographie (méthode ex vivo) et l'utilisation de modèles dits «knock-out», c'est-à-dire dépourvus de cible, peuvent vérifier cette liaison spécifique. L'autoradiographie permet aussi de corréler la distribution régionale du traceur avec la distribution connue de la cible.

La dernière étape est l'analyse cinétique qualitative. Elle est effectuée pour déterminer si le radiotraceur peut être testé chez l'homme. S'il est bien connu que la cinétique du radiotraceur varie selon les espèces, une analyse quantitative après le pic d'injection est robuste. Une pente importante après le pic après traitement par le composé non radioactif indique une diminution de potentiel de liaison ou BP mesurable sans prendre en compte les modifications de radioactivité plasmatique décrites plus haut. Par contre, une pente nulle après une telle expérience indique que le radiotraceur a une liaison irréversible ou que la cinétique d'élimination du traceur est très lente. Pour évaluer ces traceurs, il faut effectuer une injection en bolus ou selon un modèle bolus plus perfusion avec injection de composé homologue ou hétérologue (« challenge pharmacologique ») au milieu de l'examen TEP. Une diminution de pente après ces expériences de blocage indique une diminution de BP mesurable et un blocage réversible.

Il est important de souligner que le challenge pharmacologique désigne les expériences pour lesquelles on injecte un compétiteur en cours d'acquisition. L'expérience de blocage consiste à bloquer les récepteurs avant l'injection du radiotraceur. Le challenge pharmacologique permet de

mesurer un déplacement. Les études de blocage permettent de mesurer une occupation de récepteurs et de mettre en évidence la liaison spécifique d'un radiotraceur.

F. Modélisation pharmacocinétique du radiotraceur

1. Généralités

La modélisation de la cinétique du radiotraceur est une étape clé de son développement. Elle permet d'expliquer à l'aide d'un modèle d'équations différentielles, les différentes cinétiques obtenues dans les régions cérébrales. Si plusieurs articles de revue développent les bases fondamentales de la modélisation (31–46), il nous parait utile de réexpliciter la démarche de la modélisation pharmacocinétique d'un radiotraceur TEP cérébral.

2. Modèle pharmacologique ligand-récepteur

La modélisation en imagerie TEP a pour but de déterminer l'affinité d'un ligand (K_d) pour un récepteur donné et la concentration de récepteurs dans différentes régions cérébrales (B_{max}). Sa finalité est d'avoir une image quantifiée et non uniquement qualitative afin d'avoir une approche moins descriptive des processus physiopathologiques en neurologie et psychiatrie (36). Elle utilise un modèle régit par la loi d'action de masse qui simule la pharmacocinétique du traceur entre le compartiment vasculaire et le compartiment tissulaire. Les données expérimentales obtenues permettent, avec le modèle établi, de déterminer tous les paramètres pharmacocinétiques du traceur. La connaissance de ces paramètres permettra la détermination du K_d et du B_{max} dans chaque région cérébrale prédéfinie. Dans un contexte de mesure *in vivo*, on utilise plutôt la notation B_{avail} (concentration de récepteurs totale disponible), la notation B_{max} concernant les mesures *in vitro*. Les deux finalités de la modélisation sont premièrement de trouver une explication aux différentes cinétiques cérébrales, trouver un lien entre la mesure dynamique TEP et la fonction étudiée. Deuxièmement, il s'agit de donner une valeur quantitative aux paramètres d'un modèle de fixation sous forme d'indice de liaison ou « binding potential ». La modélisation fait appel à un grand nombre de modèles différents. Nous détaillerons ici uniquement le modèle de référence.

3. Définition du modèle compartimental de base modélisant l'échange ligand récepteur.

Le modèle se base sur un système d'équations différentielles d'échange ligand-récepteur bien établi que l'on cherche à résoudre. Il est composé de quatre compartiments : un compartiment plasmatique, un compartiment qui retient le ligand marqué libre, un compartiment qui retient le ligand lié et un compartiment qui représente la liaison non spécifique. Ce dernier compartiment peut être négligé dans certaines modélisations dans le cas où l'on considère que les constantes k_5 et k_6 sont très faibles par rapport aux autres.

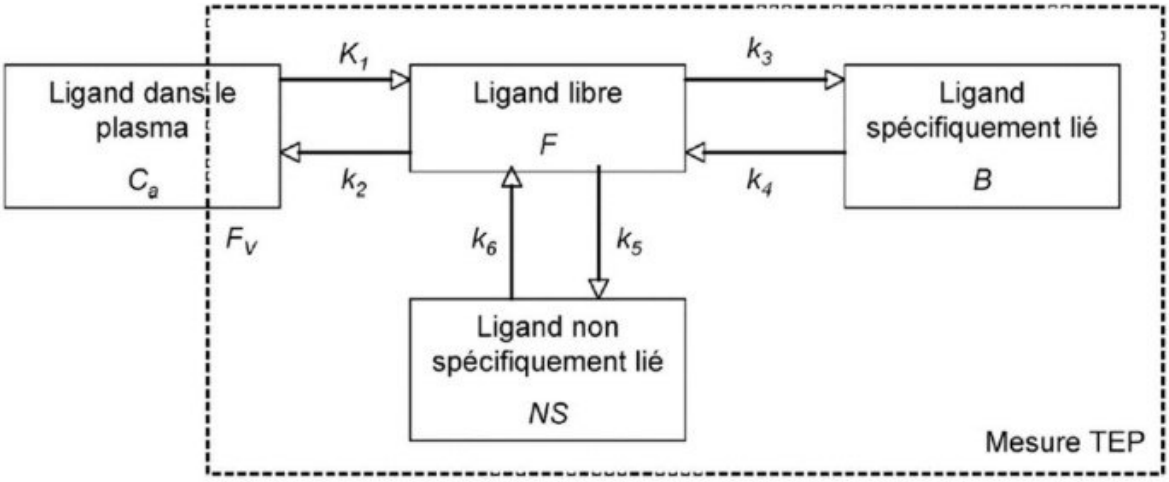


Figure 11 : modèle de base de la modélisation échange ligand récepteur in vivo (36).

4. Nomenclature du modèle compartimental

En 2007, un consortium de « leaders » d'opinion en neuroimagerie TEP a publié un article définissant une nomenclature universelle pour les paramètres des modèles pharmacocinétiques TEP et leurs indices de liaison (37).

5. Définition de la méthode expérimentale optimale

La méthode optimale pour résoudre ce modèle consiste à utiliser un protocole TEP multi-injection (31,32) : une injection de ligand « chaud » (radioactif) à dose traceuse ; une injection de déplacement par injection de ligand « froid » (non radioactif à dose pharmacologique) pour déplacer le ligand

chaud de sa cible ; une co-injection de ligand radioactif-non radioactif où l'on fait en sorte de saturer les récepteurs par le ligand non radioactif Ce modèle de multi-injection est le modèle optimal puisqu'il permet d'obtenir en une expérience des informations sur la saturabilité du système et la liaison spécifique et non spécifique du ligand.

6. Définition et résolution d'un modèle utilisé dans la méthode expérimentale optimale

Dans le modèle triple-injection du Flumazenil (47), trois compartiments sont dédoublés (trois compartiments pour le ligand chaud et trois compartiments pour le ligand froid) selon le modèle ci-dessous.

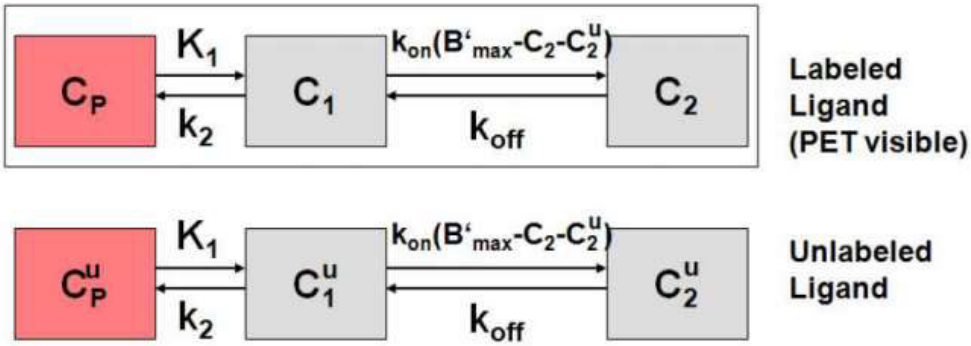


Figure 12 : modèle à 3 compartiments des interactions ligand-récepteur (38).

L'écriture du système du modèle aboutit aux équations suivantes :

$$\begin{aligned}
\frac{dC_1(t)}{dt} &= k_1C_P(t) - k_2C_1(t) - \frac{k_{on}}{V_R}C_1(t)\left[B'_{max} - C_2(t) - C^u{}_2(t)\right] + k_{off}C_2(t) \\
\frac{dC_2(t)}{dt} &= \frac{k_{on}}{V_R}C_1(t)\left[B'_{max} - C_2(t) - C^u{}_2(t)\right] - k_{off}C_2(t) \\
\frac{dC^u{}_1(t)}{dt} &= k_1C^u{}_P(t) - k_2C^u{}_1(t) - \frac{k_{on}}{V_R}C^u{}_1(t)\left[B'_{max} - C_2(t) - C^u{}_2(t)\right] + k_{off}C_2{}^u(t) \\
\frac{dC^u{}_2(t)}{dt} &= \frac{k_{on}}{V_R}C^u{}_1(t)\left[B'_{max} - C_2(t) - C^u{}_2(t)\right] - k_{off}C^u{}_2(t)
\end{aligned}$$

Figure 13 : équations différentielles obtenues pour le ligand marqué et non marqué (38).

Le système définissant la fonction d'entrée du ligand chaud est définit par l'équation suivante :

$$C_{plasma-corrected}(t) = \begin{cases} C_{plasma}\left(A_1e^{B_1(t-T_1)} + A_2e^{B_2(t-T_1)}\right) & T_1 < t < T_3 \quad \text{decay since 1}^{\text{st}}\text{ injection} \\ C_{plasma}\left(A_1e^{B_1(t-T_3)} + A_2e^{B_2(t-T_3)}\right) & t > T_3 \quad \text{decay since 3}^{\text{rd}}\text{ injection} \end{cases}$$

Figure 14 : équation définissant la fonction d'entrée du modèle (38).

On utilise un algorithme pour résoudre le système d'équations différentielles nourri par les courbes d'activités temporelles de chaque région pour déterminer l'ensemble des paramètres et la fonction d'entrée ou «estimation de la concentration plasmatique artérielle d'activité du traceur non métabolisé » (36). On réalise un ajustement des valeurs prédites par le modèle avec les valeurs mesurées en TEP.

La méthode de référence, dite gold standard, de la mesure de la fonction d'entrée dans un protocole TEP, consiste à réaliser des prélèvements artériels réguliers à partir du temps d'injection. Les prélèvements sont réalisés à intervalles très courts au début de l'injection - pour détecter le pic d'injection avec précision - puis à intervalles de plus en plus larges au fur et à mesure de l'acquisition TEP qui dure entre 100 et 180 min. Les échantillons sanguins sont utilisés d'une part pour détermination de la radioactivité plasmatique et sanguine à l'aide d'un compteur et d'autre part pour le comptage des métabolites par HPLC. Ces mesures permettent d'obtenir une courbe plasmatique totale de ligand libre non métabolisé et la fonction d'entrée corrigée des métabolites.

L'utilisation d'une méthode de multi-injections et d'une mesure de fonction d'entrée par prélèvements artériels est optimale. Toutefois, elle est cliniquement difficile à appliquer en pratique clinique. Le temps d'acquisition TEP est long (100 à 180 min), la pose d'un cathéter artériel est un geste invasif. Par ailleurs, la méthode nécessite un personnel qualifié pour la réalisation de l'examen et le traitement des échantillons sanguins.

La résolution d'un tel modèle avec l'approche gold standard permet de quantifier l'ensemble des paramètres du modèle et de simuler des cinétiques TEP obtenues dans des conditions expérimentales variées. Cette détermination exhaustive des paramètres permettra ensuite de simplifier le modèle d'équations et de déterminer un nombre plus réduit de paramètres ou d'index liés aux paramètres du modèle. On peut donc, sous réserve d'un certain nombre d'hypothèses, utiliser des méthodes simplifiées qui évitent les prélèvements sanguins artériels. Pratiquement, pour modéliser la pharmacocinétique cérébrale d'un traceur TEP, on réalise sur un nombre restreint de sujets, le protocole le plus optimal possible (multi-injection) et une détermination de la fonction d'entrée par prélèvements artériels. Les données obtenues permettront de construire le modèle pharmacocinétique du traceur. On simplifie ensuite le modèle chez les sujets suivants en évitant toute prise de sang artériel.
Il existe, en marge de ce modèle de référence, une série de modèles variés et qui sont applicables dans des conditions expérimentales plus simplifiées (injection bolus simple par exemple). L'objectif

est de trouver le modèle le plus approprié parmi tous les modèles existants : modèles à 1 compartiment et à 2 compartiments (41–43), les modèles pour ligands irréversibles (44).

7. Modélisation simplifiée

La modélisation simplifiée est pratiquée après construction du modèle par prélèvements artériels chez un nombre restreint de sujets. L'objectif de la modélisation simplifiée est de calculer les paramètres pharmacocinétiques du modèle sans avoir recourt aux prélèvements artériels pour déterminer la fonction d'entrée. Pour s'affranchir de tout prélèvement artériel, il est nécessaire de réduire le nombre de paramètres à identifier dans le modèle compartimental. Six hypothèses sont formulées pour simplifier le modèle (36):

(1). Le radioligand provient d'une source unique : le compartiment vasculaire.

(2). Le radioligand s'échange librement entre le compartiment vasculaire et le compartiment libre.

(3). Les échanges entre compartiments sont régis par des cinétiques de premier ordre : les paramètres de vitesse d'échange entre compartiments sont constants au cours de l'expérience.

(4). Les échanges entre compartiments libre et non spécifiquement lié s'équilibrent rapidement.

(5). La fraction non métabolisée du radioligand dans le plasma s'équilibre rapidement avec les protéines du plasma. La fraction libre du radioligand dans le plasma est constante au cours de l'expérience.

(6). Le volume de distribution dans le compartiment libre des régions riches en récepteur est identique au volume de distribution dans le compartiment libre des régions dépourvues de récepteurs. Le volume de distribution est défini en TEP par le rapport des concentrations tissulaires et plasmatiques.

Contraindre le modèle compartimental via la formulation de telles hypothèses permet d'introduire des indices simplifiés reliés au $B_{available}$ et au K_d du ligand sans utiliser de fonction d'entrée. Le premier groupe d'indice correspond au volume de distribution (V_t ou volume de distribution tissulaire, V_s ou volume de distribution dans le compartiment de liaison spécifique et V_{nd} ou volume de distribution dans le compartiment de liaison non spécifique). Le deuxième groupe d'indices correspond au potentiel de liaison BP. Le calcul de tels indices est relié à un nombre restreint de paramètres (dits macro-paramètres et micro-paramètres) du modèle pharmacocinétique.

8. Méthodes de résolution simplifiée des modèles

Plusieurs méthodes permettent de déterminer des index simplifiés.

Parmi elles, figure la méthode de la région de référence (36). Son principe repose sur la recherche d'une région de référence dépourvue de récepteurs et qui remplit l'hypothèse 6 [*Le volume de distribution dans le compartiment libre des régions riches en récepteur est identique au volume de distribution dans le compartiment libre des régions dépourvues de récepteurs*].

L'identification de cette région de référence permettra ensuite de calculer les paramètres k_1, k_2, k_{on}/V_r, k_{off} et B_{avail}.

La méthode graphique de Logan (39) repose sur la construction d'un graphique contenant les courbes de concentrations du traceur dans la région de référence et les courbes du traceur dans la région cible qui est linéaire et tend vers une droite asymptotique. La pente de cette droite correspond au volume de distribution relatif de la région cible. Il permet de calculer le potentiel de liaison BP_{nd}.

La méthode « Single Reference Tissue Model » (SRTM) permet la constitution d'un nouveau système d'équations différentielles (40). La solution optimale de ce système permet de déterminer le BP_{nd}, k_2 et R_1 (rapport $k_{1\ \text{région d'intérêt}}/\ k_{1\ \text{région de référence}}$).

La méthode « Simultaneous Estimation » (SIME) correspond à l'estimation simultanée de l'ensemble des paramètres du modèle compartimental et de la fonction d'entrée (46). Elle permet une quantification du volume de distribution qui permet une estimation du potentiel de liaison du ligand. Cette méthode nécessite les courbes temps-activité des différentes régions cérébrales et un point artériel prélevé à un temps optimal. L'ensemble des données est ensuite intégré dans une fonction de coût qui sera minimisée de façon à déterminer les paramètres du modèle et sa fonction d'entrée.

Les méthodes d'imagerie paramétrique constituent une alternative.

En effet, toutes les méthodes citées ci-dessus utilisent les courbes temps-activité de régions cérébrales d'intérêt basées sur des atlas anatomiques ou tracées manuellement. L'imagerie paramétrique résonne sur une modélisation compartimentale de chaque voxel et permet de s'affranchir de cette délimitation des régions cérébrales (36). On obtient ainsi une image du paramètre DVR si on applique la méthode du Logan ou une image de BP_{nd}, k_2 et R_1 pour la méthode SRTM.

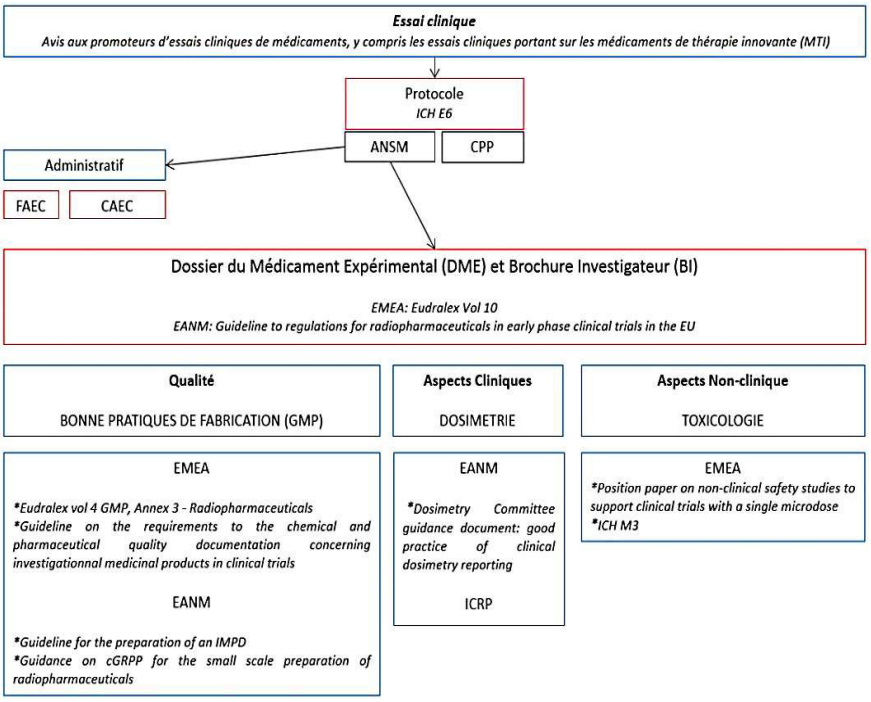
G. Le passage à l'homme

1. Généralités

Le premier passage à l'homme d'un nouveau radiotraceur est un processus long qui fait appel à des connaissances essentiellement règlementaires. En effet, il s'agit comme le médicament 'classique' de constituer un dossier d'essai clinique rassemblant toutes les informations nécessaires pour examen par l'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (ANSM) et le Comité de Protection des Personnes (CPP). Les grandes lignes de la constitution d'un essai clinique sont détaillées dans un formulaire de référence publié par l'ANSM et qui s'intitule « Avis aux promoteurs d'essais cliniques de médicaments, y compris les essais cliniques portant sur les médicaments de thérapie innovante (MTI) ».

A la lecture de cet intitulé, on comprend déjà le statut 'limite' du radiotraceur dans les textes. En effet, la matrice que l'on utilise n'évoque dans son titre que l'élaboration de dossiers pour des médicaments expérimentaux. Le radiotraceur doit-il être considéré comme tel ? Même s'il est défini comme médicament dans l'article L.5121 du Code de la Santé Publique- Médicament radiopharmaceutique, tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales – son statut de médicament expérimental, une fois que son premier passage à l'homme est effectué, demeure discutable. Par ailleurs, aucun texte règlementaire particulier n'évoque exhaustivement le contenu d'un dossier d'essai clinique pour un radiotraceur. La règlementation concernant ces essais est donc relativement floue et fait appel à des sources règlementaires variées essentiellement représentées par les recommandations de l'ICH (International Conference of Harmonization), de l'EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) et de l'ICRP (International Commission for Radiological Protection). Ces recommandations portent sur la toxicologie, l'exposition engendrée par le radiotraceur, les bonnes pratiques de fabrication et de laboratoire. Comme décrit précédemment, il y a un manque patent de guide uniformisé d'élaboration de ce type particulier d'essai. Ces difficultés ont toutefois poussé certains chercheurs à publier des synthèses recensant les prérequis majeurs pour construire un dossier d'essai clinique de premier passage à l'homme en Europe et aux Etats-Unis (48–50). La Figure 15 récapitule l'ensemble des éléments du dossier d'essai clinique de premier passage à l'homme pour un radiotraceur et quelques sources réglementaires fondatrices. Le protocole de l'essai clinique est soumis au Comité de Protection des Personnes (CPP) et à l'ANSM. Le Dossier du Médicament Expérimental et la Brochure investigateur sont soumis uniquement à l'ANSM.

*



FAEC : Formulaire d'autorisation d'essai clinique. CAEC : Courrier d'Autorisation d'Essai Clinique

Figure 15 : schéma récapitulatif du contenu du dossier d'essai clinque de premier passage à l'homme d'un radiotraceur.

Si la qualité du radiopharmaceutique est détaillée dans le dossier clinique selon les normes imposées par la pharmacopée européenne et les directives de l'EANM (European Association of Nuclear Medicine), on observe aussi que la sécurité toxicologique et radiologique du radiotraceur est l' élément clé du dossier. En effet, tous les essais cliniques sont en accord avec la déclaration d'Helsinki qui impose pour toute recherche clinique une évaluation du risque encouru par les patients se prêtant à la recherche (51). Dans la phase de développement précoce du radiotraceur, différents types de cas sont possibles : le radiotraceur peut être nouveau c'est-à-dire qu'aucune donnée toxicologique ou de cas clinique n'est renseignée. Le radiotraceur peut être lié au développement d'un candidat médicament et dans ce cas des données complètes de toxicologie sont disponibles. Enfin, le traceur peut être décrit dans la littérature de recherche fondamentale sans pour autant que des effets indésirables soient notifiés et les données toxicologiques ne sont pas dans le domaine public. Il faut donc adapter la rédaction des dossiers selon les données précliniques voire cliniques (celles des candidats médicaments correspondants). Comme nous le constaterons dans notre étude expérimentale à venir, le point flou est la nécessité de fournir de nouvelles données toxicologiques d'un traceur dont le médicament ou le candidat médicament a déjà fait l'objet de telles études.

2. Pharmacologie de sécurité

Toxicologie préclinique

L'ensemble des données de toxicologie précliniques requises pour envisager un premier passage à l'homme est décrit dans la section 7.1 de l'ICH M3 (R2) qui s'intitule « Guideline on Nonclinical Safety Studies for the conduct of Human Clinical Trials and Marketing Autorisation for Pharmaceuticals » (52). Ces directives s'adressent à l'usage de microdoses (<100µg) dans des essais cliniques exploratoires et sont applicables aux Etats-Unis, en Europe et au Japon. Dans ce contexte, le panel d'études toxicologiques est simplifié par rapport à ce qui est habituellement demandé pour tester un médicament expérimental. En résumé, il est demandé une objectivation de la cible du radiotraceur par des données *in vitro* ainsi qu'une étude toxicologique prolongée d'administration intraveineuse unique chez des rongeurs pour justifier l'usage de microdoses. On notera que ces directives s'appliquent pour des essais cliniques exploratoires de petite envergure. En effet, si l'exposition à un nombre important de sujet est notable, les données de toxicologie précliniques devront être plus étayées.

Dosimétrie

Il est par ailleurs nécessaire d'estimer le risque encouru par les sujets, posé par l'exposition de l'organisme aux rayons ionisants. Il existe une grande variété de recommandations selon les pays. Etant donné ces disparités, les données uniformisées de l'ICRP définissent un seuil maximal de 10 mSv chez le volontaire sain (53). On peut expliquer ces disparités de seuil et d'exigences selon les pays par le fait que le statut de radiotraceur n'est pas encore bien assimilé par la communauté réglementaire. Ainsi, Michel Honer, du Roche Innovation Center à Bâle, explique que la loi fédérale américaine, et plus spécifiquement la partie 361 du code réglementaire fédéral, définit des normes de doses équivalentes par organes (11). Toutefois, ces directives ne s'appliquent pas aux radiotraceurs réellement nouveaux. Elles nécessitent le renseignement que la quantité de substance active utilisée n'a aucun effet pharmacologique sur les êtres humains. On se trouve donc dans une impasse réglementaire puisque pour le développement précoce d'un radiotraceur aucune donnée clinique n'est disponible. A contrario, la réglementation d'un médicament dit « exploratoire » (« exploratory investigational new drug ») n'exige pas de limite dosimétrique explicite. Les dossiers sont analysés au cas par cas. La clarification réglementaire du statut du radiotraceur est un enjeu majeur pour leur développement.

En résumé, le cas du développement des radiotraceurs agonistes est complexe à argumenter dans les dossiers. En effet, il faut démontrer que l'on utilise un agoniste non pas pour ses propriétés effectrices susceptibles de provoquer un effet clinique mais pour son tropisme particulier sur des récepteurs. On utilise des microdoses qui empêchent tout effet pharmacologique. Cette notion d'utilisation d'un agoniste radiotraceur sans effet clinique attendu reste compliqué à faire admettre à la communauté réglementaire, habituée au cadre du médicament à doses pharmacologiques.

Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)

La réalisation d'un essai clinique requiert de la part du promoteur des exigences de qualité du produit expérimental testé. Ces exigences sont détaillées dans la Pharmacopée Européenne.

Les dernières années ont fait l'objet de nombreux questionnements quant aux directives de synthèse des radiopharmaceutiques en recherche clinique. En effet, la pharmacopée impose des normes réglementaires aux médicaments expérimentaux. Les radiotraceurs sont une classe bien particulière de produits expérimentaux qui remet parfois en cause le cahier des charges prédéfini. Par exemple, la pharmacopée impose des tests de stérilité. Toutefois, les radiotraceurs sont administrés directement après leur radiosynthèse et les résultats des tests de stérilité sont obtenus à partir de 2 à 3 semaines. Les normes de qualité du produit expérimental ne sont pas toujours évidentes à appliquer pour le radiopharmaceutique (11). Par ailleurs, dans le cadre des mesures de radioprotection des personnels, les pressions des zones critiques sont gardées inférieures à celles des alentours alors que les Bonnes Pratiques de Fabrication recommandent une pression plus haute dans les zones de production pour éviter toute contamination (11). Les recommandations de la Pharmacopée Européenne s'accompagnent de directives spécifiques aux radiotraceurs. Ces directives sont issues d'un consortium de plusieurs experts affiliés à l'Association Européenne de Médecine Nucléaire (EANM). L'article fondateur aborde les bonnes pratiques de fabrication des radiopharmaceutiques à faible échelle (54). Par ailleurs, une directive européenne datant de 2014 (N°536/2014) évoque l'assouplissement des bonnes pratiques de fabrication pour les radiopharmaceutiques à faible échelle de production (55). Cette adaptation est essentielle pour éviter le flou qui règne dans le domaine du développement des radiotraceurs. Enfin, Michael Honer, cité précédemment, évoque un point confus concernant la fabrication du radiopharmaceutique (11). Il pose la question des prérequis nécessaires du précurseur de synthèse. Doit-il être fabriqué selon les bonnes pratiques de fabrication ? Peut-on s'affranchir de cette norme ? En effet, dans les processus de synthèse des radiotraceurs, les étapes de purification de caractérisation de la qualité du produit n'interviennent qu'en fin de synthèse. Par ailleurs, le précurseur de synthèse n'entre pas dans la définition de « substance active » -substance nécessitant une fabrication selon les bonnes

pratiques-explicitée dans la pharmacopée européenne (56). Toutefois, en Europe, il est indispensable que le précurseur réponde nécessairement aux bonnes pratiques de fabrication.

Méthodologie d'évaluation du radiotraceur chez l'homme

La méthodologie suivie chez l'homme recoupe celle utilisée en préclinique. La première étape est d'évaluer l'absorption et la biodistribution cérébrales chez des volontaires sains. Le protocole habituel se compose d'une acquisition dynamique d'images TEP accompagnée de prélèvements artériels réguliers pour obtenir la fonction d'entrée artérielle corrigée des métabolites. Ces données permettent la modélisation compartimentale du radiotraceur.

L'analyse des courbes temps-activité (TACs), chez au moins deux sujets, permet de savoir comment le radioligand entre dans le cerveau. Idéalement, le pic cérébral doit coïncider avec le pic plasmatique. La distribution du radiotraceur doit être en accord avec celle de la cible, la distribution de la cible étant déterminée par des études post-mortem. Le profil cinétique du radiotraceur doit présenter un ratio liaison spécifique sur liaison non spécifique optimal. Aucun métabolite ne doit entrer dans le cerveau. On doit observer une absorption claire et une élimination rapide. Enfin, l'analyse des TACs permet la détection d'une éventuelle défluorination dans le cadre des radiotraceurs marqués au fluor-18.

La deuxième étape consiste à réaliser des études de blocage de la cible. On compare un scanner TEP sans intervention pharmacologique et un scanner obtenu après injection d'un composé homologue ou hétérologue à dose pharmacologique pour bloquer la liaison spécifique du radioligand et valider la liaison à sa cible. Ces données permettent aussi de tester la validité d'une région de référence, région dépourvue de cible et insensible aux pré-injections. Il s'agit d'une étape importante puisqu'elle permet de réaliser une quantification complète de la cible en s'affranchissant de prélèvements artériels qui constituent une manœuvre invasive et lourde. In fine, l'objectif est d'obtenir une fonction d'entrée indirecte par l'image. On peut aussi appliquer des méthodes de quantification sans région de référence.

Ensuite, il s'agit d'effectuer la mesure de variabilité de la liaison du radiotraceur via une étude de test-retest : on étudie la variabilité intra sujet et la variabilité inter sujet du signal. Une étude de dosimétrie par réalisation d'un scanner corps entier est recommandée avant d'utiliser le traceur pour répondre à des questions de recherche.

On notera que les propriétés requises pour un radioligand dépendent de ses applications. Un radioligand mesurant la libération de neurotransmetteur montrera une faible reproductibilité due à sa sensibilité importante à un neurotransmetteur. Un radioligand mesurant un nombre de sites disponibles doit montrer un signal stable et reproductible dans le temps. Le tableau ci-dessous récapitule les étapes pour effectuer un passage chez l'homme.

Evaluation of ligand candidates in human
• Tracer meets design requirements in preclinical studies • GMP audit to assess compliance of positron emission tomography (PET) centre with applicable cGMP requirements • Synthesis of precursor material • Pharmacology and toxicology studies as per ICH M3 (R2) • Dosimetry study in rodents • Clinical protocol developed • Preparation of abbreviated CMC section for application to health authority • Validation of radiochemistry at PET centre • CTA application for EU or eIND or IND application for USA • Ethics committee or Institutional Review Board application • Radiation safety committee approval (if required e.g. ARSAC application for the UK) • All approvals granted • Clinical studies begin in healthy volunteers • Acquisition of baseline data to evaluate brain entry and distribution (each subject has one scan)[a] • Blocking studies (if possible) to evaluate *in vivo* selectivity and assess possible reference regions (each subject has two scans: (i) baseline and (ii) blocked – i.e. after medication) • Collection of test–retest data • Collection of whole-body human dosimetry data • Further studies in healthy volunteers and patients (e.g. examination of variability in binding with age, sex, disease severity, etc.)
Abbreviations: cGMP/GMP, (current) good manufacturing practices; CMC, chemistry, manufacturing and controls; CTA, clinical trial authorisation; ARSAC, Administration of Radioactive Substances Advisory Committee. [a]Scans include an arterial blood sampling to provide a metabolite-corrected plasma input function.

Tableau 4 : les étapes que doit franchir un radiotraceur TEP pour devenir un radiopharmaceutique injectable à l'Homme (11).

IV. Quels sont les rôles identifiés des radiotraceurs en neuropharmacologie ?

On abordera ici l'ensemble des applications fondamentales et cliniques des radiotraceurs TEP. La discussion s'adresse spécifiquement aux radiotraceurs ligands de neurorécepteurs. En effet, les autres radiotraceurs portant sur d'autres cibles que des récepteurs sortent du champ d'application de ce mémoire. Alors que théoriquement les domaines fondamentaux et cliniques de la science sont bien clivés, il est difficile d'en faire autant lorsque l'on aborde l'imagerie TEP. En effet, la TEP mélange les genres et on est contraint d'aborder ses applications en dehors du clivage classique : la recherche du domaine privé se mêle souvent à la recherche du domaine public. C'est pourquoi on constate souvent un développement de radiotraceur par un laboratoire académique concomitant à

celui d'un médicament par un laboratoire privé. Dans ce contexte, on évoquera les expériences communément utilisées et on détaillera leur place dans le développement du médicament.

A. Concepts fondamentaux

3. Etude de la liaison aux récepteurs

Mesures de densité des récepteurs

La simple injection d'un radiotraceur permet d'évaluer la densité de récepteurs dans des conditions expérimentales différentes et d'effectuer une comparaison. Par exemple, on peut effectuer cette comparaison entre un état sain et un état pathologique. On peut aussi comparer la liaison entre une condition contrôle et une condition ou l'on injecte un médicament. On obtient ainsi des informations sur l'influence d'une condition sur la liaison d'un radiotraceur à un récepteur donné.

Mesures d'occupation des récepteurs

L'imagerie TEP permet aussi de mesurer le pourcentage d'occupation d'un médicament à partir d'un radiotraceur de référence. On compare les images obtenues à partir de la simple injection du radiotraceur avec celles obtenues avec pré-injection de médicament. Le pourcentage d'occupation des récepteurs s'exprime comme un ratio de potentiels de liaison comme suit (57):

$$Occupation\ Récepteurs = 100 \times \frac{(BPbaseline - BPmédicament)}{BPbaseline}$$

Figure 16 : équation d'occupation des récepteurs

La détermination de ce pourcentage nécessite une région de référence pour le radiotraceur. Toutefois, il est possible de déterminer l'occupation des récepteurs sans région de référence dans l'hypothèse que l'occupation des récepteurs et que le V_{nd} sont uniformes dans toutes les régions cérébrales (58). On regroupe ces études sous le nom de « receptor occupancy studies ».

4. Mesures des variations de neurotransmetteurs endogènes

Il s'agit ici d'évaluer les changements de liaison induits par l'introduction d'un compétiteur en cours d'acquisition (59). On parle alors de « challenge pharmacologique ». Ce compétiteur peut être le neurotransmetteur endogène. Dans ce cas, on utilise un médicament qui stimule le relargage de neurotransmetteur. Le compétiteur peut être un médicament agissant sur les mêmes sites que le radiotraceur. Il est aussi possible de se placer dans des conditions de déplétion d'un neurotransmetteur et de voir les changements de liaison du radiotraceur. Ces études permettent d'évaluer la sensibilité du radiotraceur et d'envisager des mesures d'occupation basales d'un neurotransmetteur donné. On peut ensuite confronter ce taux d'occupation basal à ceux obtenus dans diverses conditions expérimentales ou pathologiques.

5. Etudes d'activation

Enfin, on peut obtenir l'imagerie de l'impact de la prise d'un médicament ou de l'exécution d'une tâche sur la liaison d'un radiotraceur. Ceci permet de mettre en évidence l'implication d'une molécule, d'une tâche, sur un système de neurotransmission. L'ensemble de ces études se déclinent pour le développement du médicament.

B. Quelle est la place de la TEP dans le développement du médicament ?

Le développement du médicament est un processus long et coûteux. Il existe un taux d'attrition important des différents candidats médicaments au cours de leur développement. L'imagerie TEP constitue un outil intéressant pour optimiser la recherche du médicament de sa phase précoce (phase 0) jusqu'aux phases de développement (phases 1 à 3), voire même au stade post-Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Ainsi, l'imagerie moléculaire TEP reste une méthodologie unique permettant d'accélérer le développement du médicament (60).

En pratique, on réalise soit le radiomarquage du médicament sans changer sa structure, soit on utilise un radioligand de référence ayant la même cible que le médicament d'intérêt. Dans les deux cas, les examens TEP apportent des informations cruciales.

Les différents types d'études TEP qui peuvent être envisagées sont pour la localisation de la cible, la quantification de cette même cible, la caractérisation des phénotypes de maladies, l'évaluation de l'efficacité du composé, le « microdosing », les études pharmacocinétiques (Figure 17).

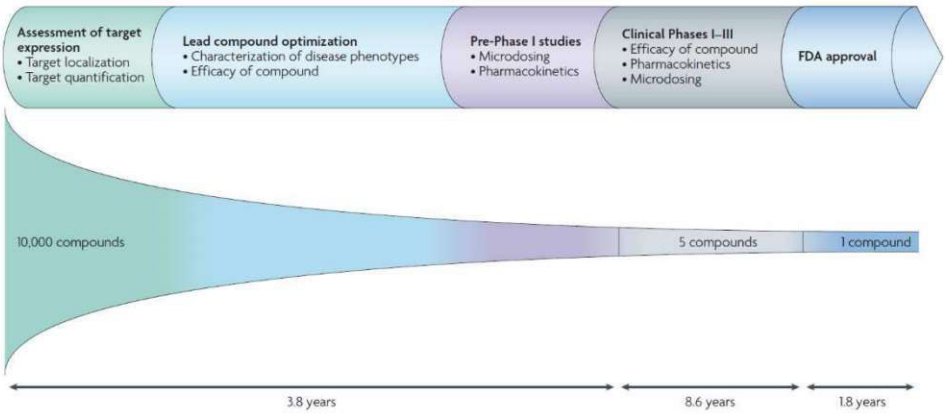


Figure 17 : le rôle de l'imagerie TEP dans le développement du médicament (61).

De manière plus exhaustive, les applications TEP dans le développement du médicament peuvent aller des premières phases précliniques jusqu'aux phases post-AMM les plus abouties (66), véritables outils au service du récent concept de « pharmacologie de précision ».

Early phase development
• Molecule biodistribution studies confirming molecule reaches the target tissue and does not accumulate in non-target sites of potential toxicity
• Target PK (dose–target occupancy) measurements guiding dose selection
• Pharmacodynamic biomarkers for proof of pharmacology, stronger 'reasons to believe' or contributing key rationale for proof of concept
• Translational preclinical imaging to identify or validate new imaging biomarkers and or provide early differentiation between candidates based on target PK or PD responses
• *In vivo* measures for monitoring safety or toxicity
Late phase development
• Surrogate markers of response more sensitive than clinical measures
• Stratification of patients based on potential for treatment efficacy
• Pharmacological differentiation of asset from marketed drugs or new competitor compounds
Marketed drugs
• Differentiation between available treatments
• Earlier detection of disease or associated pathology:
• Improved disease classification/diagnosis
• Diagnosis of pre- symptomatic or minimally symptomatic disease
• Improved identification of chronic disease exacerbation/recurrence
• Patient stratification based on disease sub-phenotype or early treatment response

Figure 18: rôle de l'imagerie TEP dans le développement du médicament et dans les études post-AMM (62).

La TEP permet ainsi de répondre à des questions centrales concernant la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament-candidat (57,63):

1. Dans le cas où le médicament peut être directement radiomarqué, quelle est sa biodistribution ? Quelle est la distribution du médicament dans le cas où il ne peut être radiomarqué ? On parle de « biodistribution study » et de « target exposure ». Ces études sont réalisées en phase 0 du développement et sont communément appelées études de « PET microdosing ».

2. Est-ce que le médicament-candidat interagit avec la cible d'intérêt et de quelle manière ? On parle de « target engagement » ou « proof of target ».

3. Quelle est la relation quantitative entre la concentration plasmatique et l'occupation de la cible, les paramètres pharmacocinétiques, les paramètres pharmacodynamiques ? On parle ici de « target receptor occupancy ».

3'. Quel est ledegré d'occupation du récepteur par le médicament lorsqu'il produit un effet pharmacologique pertinent ? On parle ici de « proof of mechanisms ».

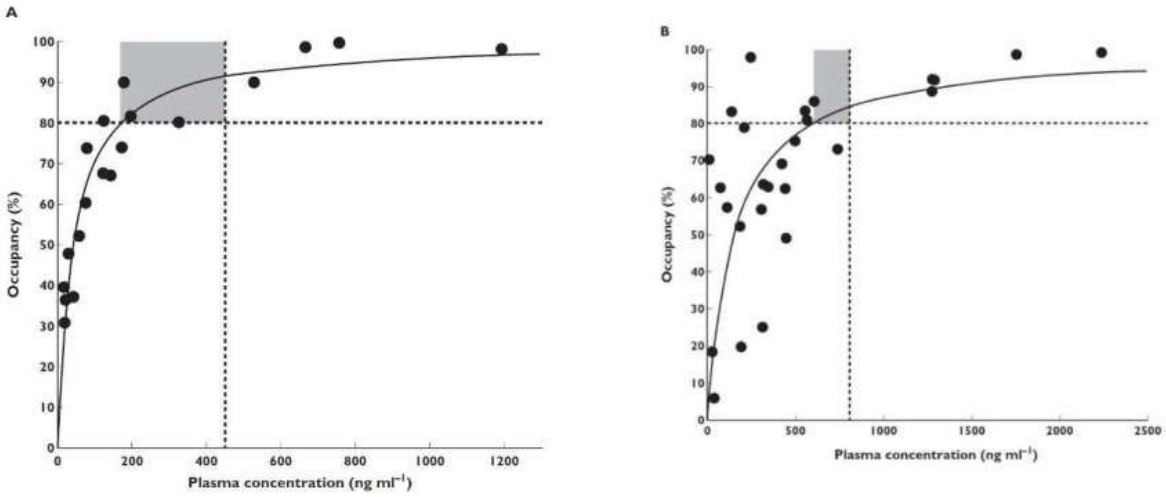


Figure 19: illustration de l'intérêt des études de « target occupancy » pour optimiser le développement du médicament (62).

Dans ce cas présent, deux candidats médicaments sont évalués. L'imagerie TEP a permis de représenter l'occupation des récepteurs en fonction de la concentration plasmatique de chaque médicament. Des études annexes ont prouvé que l'effet pharmacologique est bénéfique pour une occupation de 80% des récepteurs. Sur les deux courbes, on voit que pour le médicament A, l'occupation de plus de 80% des récepteurs couvre une plage plus étendue de concentration plasmatique que le médicament B. Autrement dit, la fenêtre thérapeutique du médicament A est plus importante que celle du médicament B. Le laboratoire écarte donc la molécule B du développement.

4. Le radiotraceur permet-il d'effectuer un suivi longitudinal pour contrôler l'effet du traitement ?

4'. Quels sont les effets pharmacologiques succédant à cette interaction et combien de temps durent-ils ? Quels sont les effets du médicament sur la pathologie ? On parle ici de « proof of efficacy ».

5. Est-il possible de stratifier des populations de patients pour accélérer l'essai clinique ou pour donner plus de valeur à la molécule ? Autrement dit, existe-t-il des groupes de patients répondeurs ?

Les radiotraceurs de référence ou les médicaments radiomarqués constituent donc de réels biomarqueurs du développement. On peut les utiliser comme biomarqueur d'une activation pharmacologique et aussi bien comme biomarqueur d'une réponse pharmacodynamique. On notera qu'une même expérience en TEP peut répondre simultanément à plusieurs questions (57).

Dans le sous-chapitre suivant, nous détaillerons la phase 0, application majeure des radiotraceurs TEP du SNC.

C. Le cas de la phase 0 ou « PET microdosing »

Les études de « PET microdosing » appartiennent aux études de biodistribution que l'on peut voir dans le développement d'un radiotraceur. Ce concept est bien décrit par Bergström et al (64). En pratique, ces études consistent à injecter une microdose ou dose infra-thérapeutique de candidat médicament, dans un contexte de développement précoce, pour obtenir des informations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. On utilise soit des doses de médicament radiomarqué (si le médicament est facilement « radiomarquable » et que sa structure est inchangée), soit un radioligand de référence susceptible d'être déplacé lors de l'injection du candidat médicament (65). En général, on utilise des ligands de références parce que les conditions pour obtenir un bon candidat médicament radiomarqué sont difficiles à atteindre.

Les informations recherchées sont majoritairement l'évaluation du passage de la BHE, la distribution cérébrale de la molécule, son métabolisme et sa sélectivité pour la cible. L'imagerie TEP a en effet une sensibilité de l'ordre du picomolaire et constitue un outil précieux pour une évaluation sécuritaire d'un candidat médicament chez l'homme avant même l'obtention complète des données de toxicologie. Dans l'hypothèse qu'il existe une corrélation entre les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques en microdose et à dose pharmacologique, ce type d'étude permet de prédire les paramètres du médicament utilisé à doses pharmacologiques (65).

Dans ce contexte, l'EMEA (Agence Européenne d'Evaluation du Médicament) a défini la microdose comme étant le centième de la dose pharmacologique d'un médicament évaluée par des études *in vitro* et *in vivo* précliniques. Cette microdose ne doit pas dépasser 100 microgrammes (66).

Bon nombre de laboratoires pharmaceutiques ont intégré cette étape de microdosing dans leur schéma de développement sous la dénomination d'étape de phase 0. Il était effectivement important de démarquer cette phase de la phase 1 qui s'accorde plus à démontrer la tolérabilité et la sécurité du médicament que des informations PK et PD.

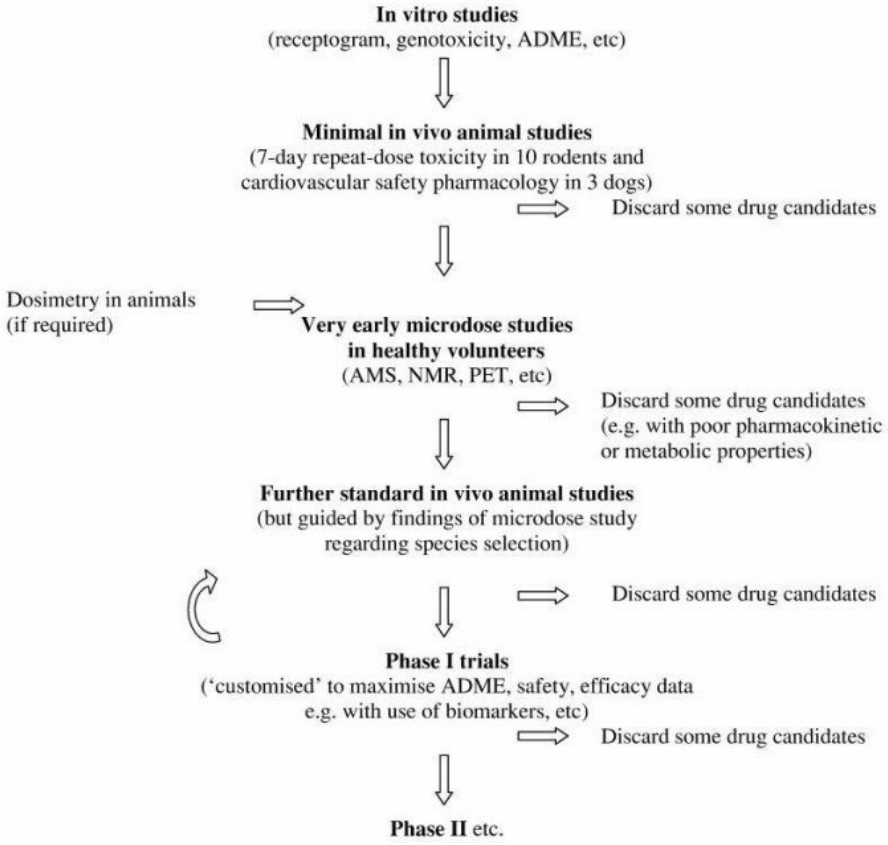


Figure 20 : nouveau modèle de développement intégrant la phase 0 (67).

Du fait de l'innocuité apparente de cette phase 0 et de son usage dans la période très précoce du développement, l'EMEA et d'autres autorités réglementaires (FDA, …) ont proposé un assouplissement des prérequis de sécurité traditionnellement nécessaires pour un premier passage à l'homme (69). En effet, la réalisation d'une phase 0 comporte moins de risques iatrogènes qu'une phase 1 où l'on utilise des doses pharmacologiques de médicament. Toutefois, comme cité précédemment, la phase 0 est sujet à débats et controverses puisqu'il n'existe pas de recommandations claires quant aux prérequis sécurité nécessaires (65).

Point non négligeable, l'émergence de cette phase 0 s'inscrit aussi dans la politique de limitation de l'usage des animaux pour l'expérimentation (65,67). En effet, l'intégration d'une phase 0 bouleverse le schéma traditionnel de développement en intégrant le test chez l'homme de façon rapide.

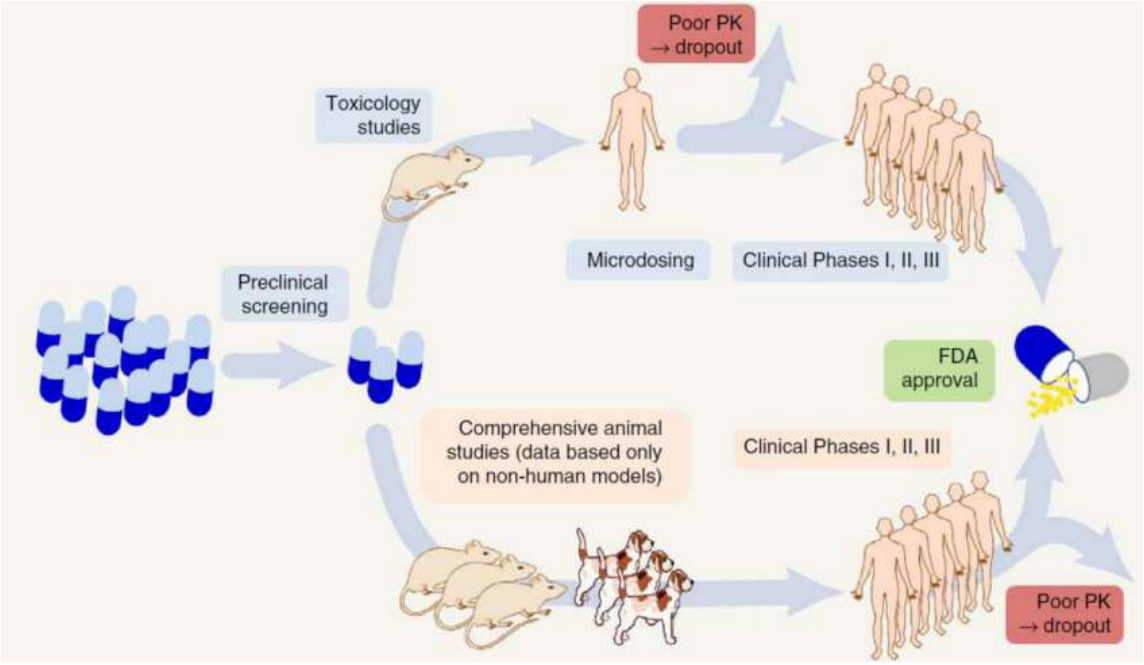


Figure 21 : positionnement de la phase 0 dans le développement du médicament. La phase 0 permet une économie significative d'animaux utilisés lors des phases précliniques (68).

Enfin, l'utilisation de cette phase 0 constitue un outil intéressant pour éliminer rapidement les médicaments candidats non prometteurs en procurant très précocement des données *in vivo*. Même si la TEP est une technique très coûteuse, elle s'avère bénéfique pour éviter le développement trop poussé (phase 1, 2 voire 3) de candidats non viables.

D. Le radiotraceur comme biomarqueur des pathologies neurologiques

Il a bien été vu dans le paragraphe précédent que le radiotraceur TEP peut être, sous certaines conditions, un biomarqueur du développement.

Si l'on se place plus dans un contexte pathologique, il apparaît que le radiotraceur TEP a aussi une place comme biomarqueur d'une pathologie neurologique ou d'un désordre neuropsychiatrique. En effet, il est possible en neuropharmacologie de mettre en évidence les changements de densité de récepteurs au niveau de plusieurs types de synapses (dopaminergiques, noradrénergiques, sérotoninergiques…) et de dresser de véritables cartes synaptiques d'une pathologie.

Le travail de revue effectué par Nikolaus et col. de l'hôpital universitaire de Düsseldorf illustre bien cette application (69). L'équipe a rapporté l'ensemble des variations connues ou supposées de la densité de récepteurs dans diverses pathologies neurologiques. Ceci a permis de représenter des

cartes de variations de densité de récepteurs pour différents systèmes synaptiques par rapport au contrôle, notamment pour la maladie d'Alzheimer (Figure 22).

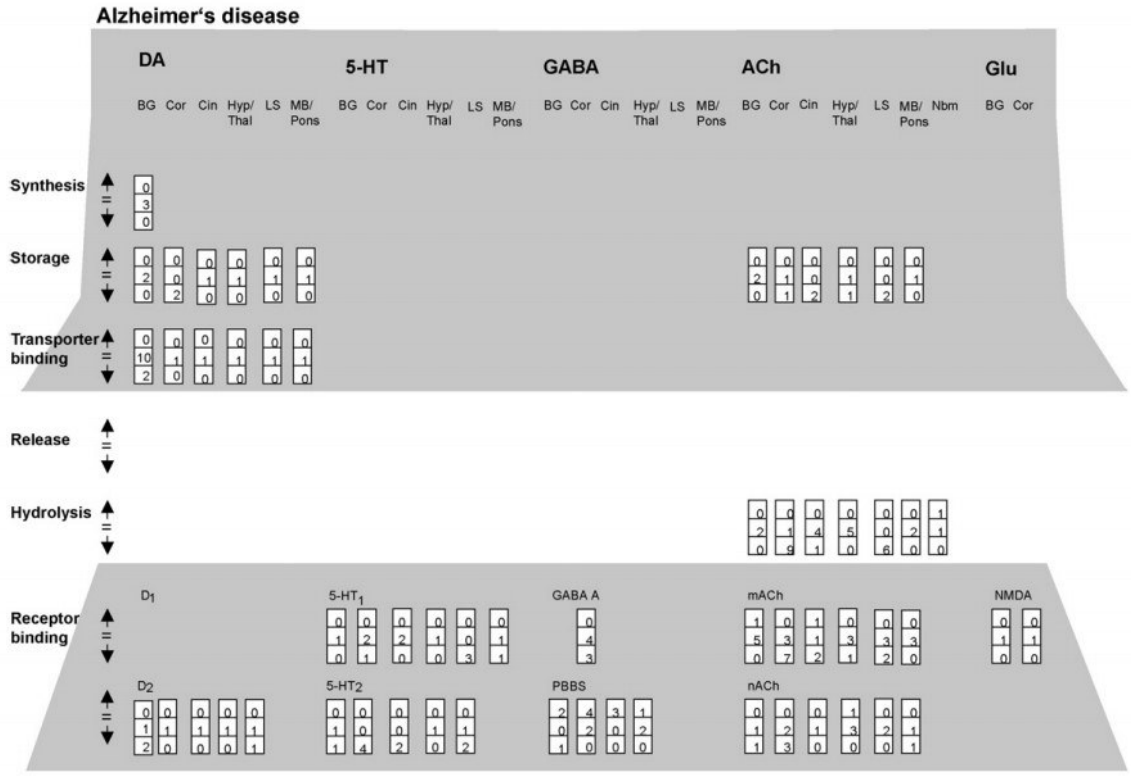


Figure 22 : récapitulatif des changements synaptiques observés in vivo dans la maladie d'Alzheimer et positionnements des explorations par imagerie TEP (69).

V. Synthèse

Le développement d'un radiotraceur, des premières étapes radiochimiques aux frontières des explorations cliniques est un processus itératif et coûteux qui fait intervenir une multitude de compétences dans un contexte de screening haut débit (70).

Il nécessite d'abord des connaissances biologiques aiguisées de la cible à atteindre. Le passage direct vers l'imagerie préclinique en évitant les étapes précédentes est envisageable pour optimiser le développement. Etant donné les variations inter-espèces, le passage rapide vers les études sur le primate est pertinent pour envisager un passage chez l'homme.

Par ailleurs, la TEP est une imagerie dynamique qui impose des cinétiques de radiotraceurs suivant des paramètres précis et variant selon l'application envisagée. Ces exigences pharmacocinétiques et radio-physico-pharmaco-chimiques sont à l'origine d'un taux d'attrition important.

Toutefois, la TEP s'avère être un outil efficace pour optimiser le développement du médicament des phases précoces aux phases post-AMM (Figure 23).

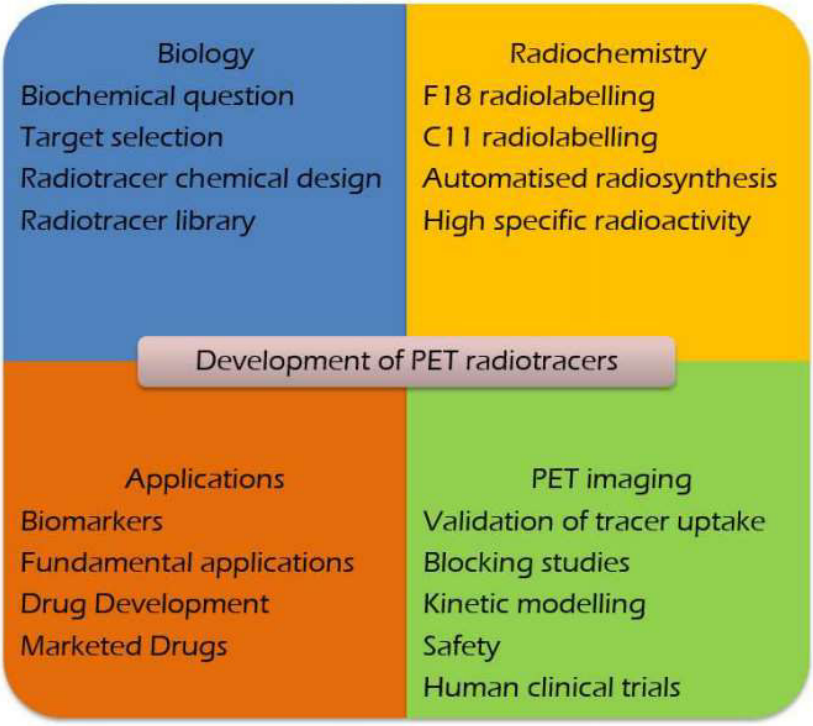


Figure 23 : les étapes du développement du radiotraceur.

CHAPITRE 2 : LE MODELE LIGAND-RECEPTEUR EN PHARMACOLOGIE

La poursuite de notre exposé, qui a pour but de poser les bases nécessaires à la compréhension de nos études expérimentales, nécessite ici de préciser les principaux concepts pharmacologiques essentiels à la compréhension de l'interaction radiotraceur-récepteur. Nous partirons des concepts simplifiés pour aller vers des modèles plus élaborés appliqués à la neuroimagerie TEP.

I. Modèle ligand-récepteur

Le modèle ligand-récepteur obéit à un schéma simplifié et didactique, tel que représenté dans la Figure 24.

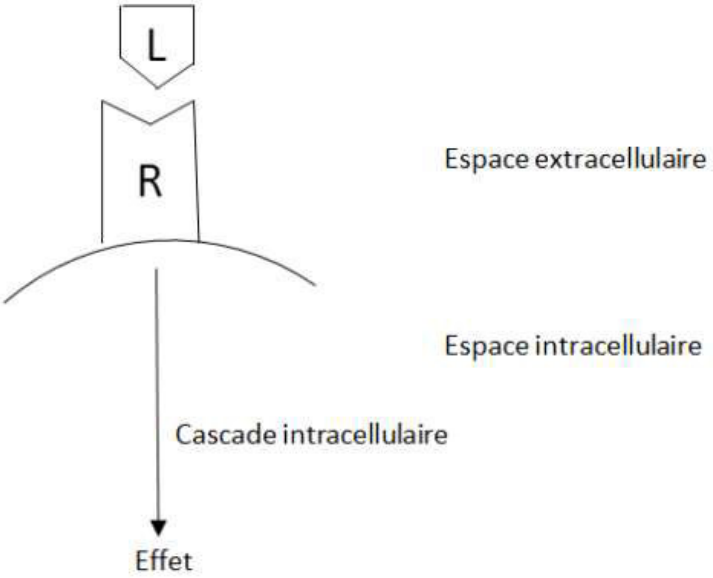


Figure 24 : schéma illustrant le modèle simplifié ligand-récepteur(71).

La liaison du ligand (en l'occurrence le neurotransmetteur) au récepteur entraîne une transduction du signal dans le domaine intracellulaire puis un effet physiologique à l'échelle macroscopique. Le modèle classique ligand-récepteur est régi par la loi d'action de masse (Figure 25).

$$(R) + (L) \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (R/L)$$

Figure 25 : équation régissant le modèle ligand (L)-récepteur (R) (71).

En neuropharmacologie, le site principal de cette interaction est la synapse pharmacologique.

La synapse est le lieu d'interaction entre l'axone ou projection d'un neurone et la dendrite d'un autre neurone. La transmission du signal sous forme électrique (différence de potentiel) est assurée entre les neurones par les neurotransmetteurs. Les récepteurs post-synaptiques assurent la transmission du signal. Les neurotransmetteurs possèdent chacun un mécanisme de recapture spécifique. Enfin, il existe un mécanisme de régulation de cette jonction interneuronale par l'intermédiaire de récepteurs présynaptiques qui stimulent ou inhibent le relargage de neurotransmetteurs dans le domaine extracellulaire. Les récepteurs présynaptiques peuvent être de même nature que les récepteurs postsynaptiques, on les appelle autorécepteurs. Les récepteurs présynaptiques peuvent être de nature différente des récepteurs postsynaptiques, dénommés hétérorécepteurs.

II. Caractéristiques de la cible d'un ligand

La cible d'un ligand ou récepteur doit répondre à cinq critères précis. Ces critères sont l'affinité, la saturabilité, la réversibilité, la stéréospécificité et la corrélation. Plus l'affinité d'un ligand pour sa cible est forte, plus cette cible a des chances d'être un récepteur. La liaison spécifique au récepteur est saturable contrairement à la liaison non spécifique. La liaison d'un ligand à sa cible est la somme de sa liaison non spécifique et de sa liaison spécifique (Figure 26).

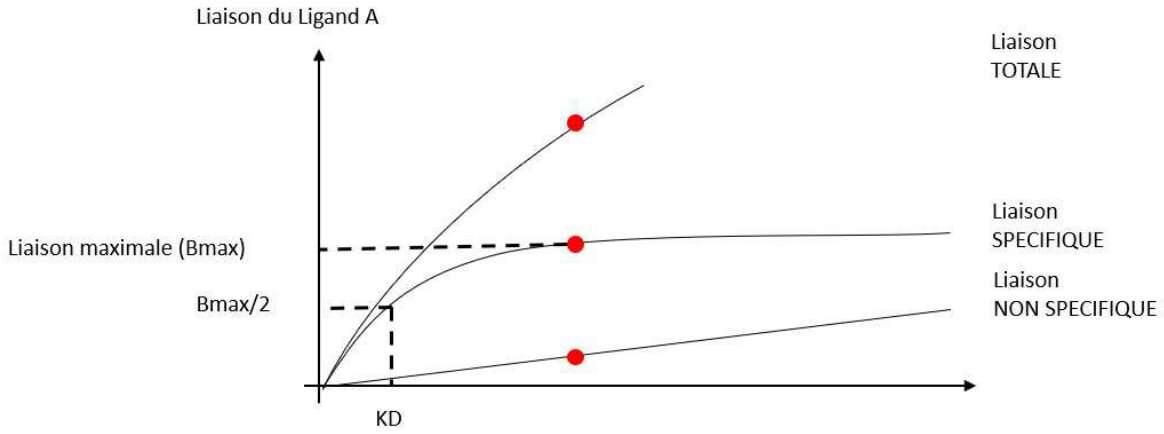


Figure 26 : représentation de la liaison spécifique et non spécifique d'un ligand en fonction de sa concentration (71).

La plupart des interactions ligand–récepteur s'effectue selon un mécanisme réversible. Le site d'action du récepteur influence les effets d'un ligand et de ses isomères. Suivant le type de

configuration spatiale, le ligand provoque une réponse différente. Il doit exister une corrélation entre la liaison que l'on observe *in vitro* et les effets obtenus *in vivo*.

III. Notion d'affinité, de spécificité et de sélectivité

Un ligand est déterminé par son affinité pour son récepteur. Un ligand se caractérise aussi par sa spécificité, c'est-à-dire sa capacité à se fixer uniquement sur une ou plusieurs cibles. Sa sélectivité est sa capacité à fixer une seule cible en particulier. Par exemple, si un ligand se fixe uniquement sur les récepteurs sérotoninergiques, on dira qu'il est sélectif. Toutefois s'il se fixe sur des tissus, on dira qu'il n'est pas spécifique.

IV. Caractérisation de la liaison spécifique d'un ligand

La détermination de ces caractéristiques est faite selon des techniques de « binding » *in vitro* (sur des préparations subcellulaires ou des coupes de tissu) ou *in vivo*. En général, on utilise la radioactivité pour déterminer l'affinité du ligand d'intérêt. D'une part, l'objectif est de déterminer l'affinité du ligand pour sa cible. Concrètement, il s'agit de mesurer la constante de dissociation ou Kd du ligand exprimée en concentration (nM). Si le Kd est inférieur à 10 nM on pourra parler d'une affinité satisfaisante et d'une liaison spécifique. D'autre part, on détermine la densité de récepteurs ou Bmax souvent exprimée en fentomoles de ligands par milligramme de la préparation biologique. Pour déterminer ces paramètres, on peut dessiner la courbe de saturation de la liaison spécifique du ligand en fonction de sa concentration. Le Bmax correspond à la saturation maximale de la liaison spécifique. Le Kd correspond à la concentration pour laquelle la moitié des récepteurs sont occupés (Figure 27).

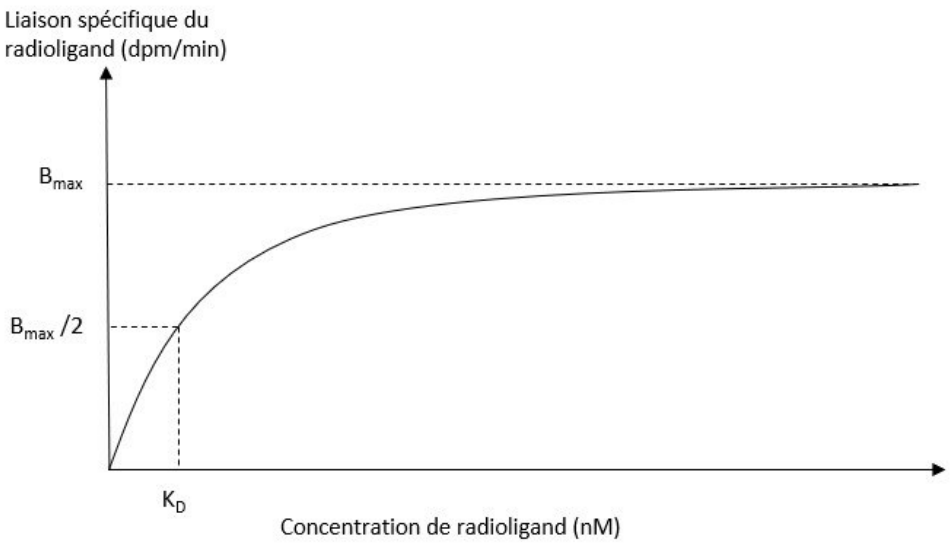


Figure 27 : courbe de saturation d'un ligand (71).

Il est possible de linéariser cette représentation pour améliorer la précision de la méthode. On obtient ainsi une représentation de Scatchard (Figure 28).

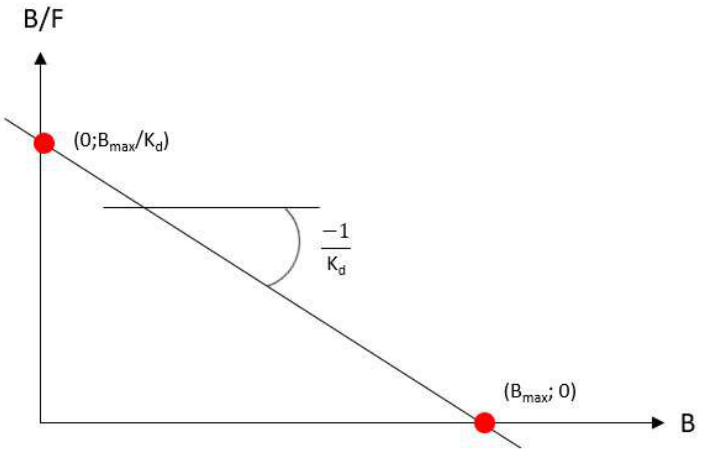


Figure 28 : représentation de Scatchard d'un ligand. B correspond à la concentration de ligand lié et F correspond à la concentration de ligand libre. B/F correspond au ratio de la concentration de ligand lié sur la concentration de ligand libre (71).

Il est aussi possible de déterminer l'affinité d'un ligand en réalisant une expérience de compétition. On étudie dans ce cas la capacité du ligand à déplacer un ligand de référence. Dans ce cas, l'équilibre est régi par l'équation suivante :

Figure 29 : équation modélisant l'interaction Ligand(L)-Récepteur(R)- (I)Inhibiteur (71).

On obtient ainsi une courbe sigmoïde qui permet de déduire l'IC_{50} ou concentration de ligand déplaçant 50% du ligand de référence. Cet indice est relié à la constante d'inhibition qui évalue comme le Kd l'affinité du ligand pour son récepteur.

$$Ki = \frac{IC50}{(1 + L)/Kd}$$

Figure 30 : équation reliant l'IC_{50} et le K_i du ligand testé (71).

La méthode de détermination de l'affinité par réalisation d'expérience de saturation requiert l'usage de ligand radioactif. Dans le contexte du développement de radiotraceur, il arrive qu'aux stades précoces, le traceur ne soit pas encore marqué. La réalisation d'expériences de compétition utilisant un radioligand de référence permet d'utiliser le ligand non marqué et de définir son affinité.

V. Définitions de l'agonisme et de l'antagonisme

Un agoniste entier est un ligand qui produit une réponse maximale suite à sa liaison sur un récepteur. La réponse n'est pas proportionnelle au nombre de récepteurs occupés. Un agoniste partiel est un ligand qui produit une réponse après sa liaison mais celle-ci n'est pas optimale. Un agoniste inverse est un ligand qui produit une réponse inverse à celle qui est normalement induite par un agoniste. Enfin, un antagoniste est un ligand qui se fixe sur ses récepteurs et ne produit aucun effet physiologique. Son action est mise en évidence uniquement en présence d'agoniste.

L'antagoniste peut être compétitif c'est-à-dire qu'il possède le même site de fixation que les agonistes du même récepteur. Dans ce cas, le blocage peut être inversé par de fortes doses d'agoniste. L'antagoniste peut être non compétitif, c'est-à-dire que son site de fixation sur le récepteur est différent de celui des agonistes. Lorsque l'on qualifie une molécule d'agoniste ou d'antagoniste, il faut faire preuve de prudence quant à l'attribution de ces qualificatifs. En effet, le caractère agoniste ou antagoniste d'un ligand dépend de la dose à laquelle il est utilisé. Un ligand peut, à petites doses, se comporter comme un agoniste et, à fortes doses, se comporter comme un antagoniste, par exemple.

VI. Caractérisation de l'effet du ligand : Notion de puissance et d'efficacité

La construction de courbe effet-dose (Figure 31) permet de terminer la puissance et l'efficacité du ligand étudié.

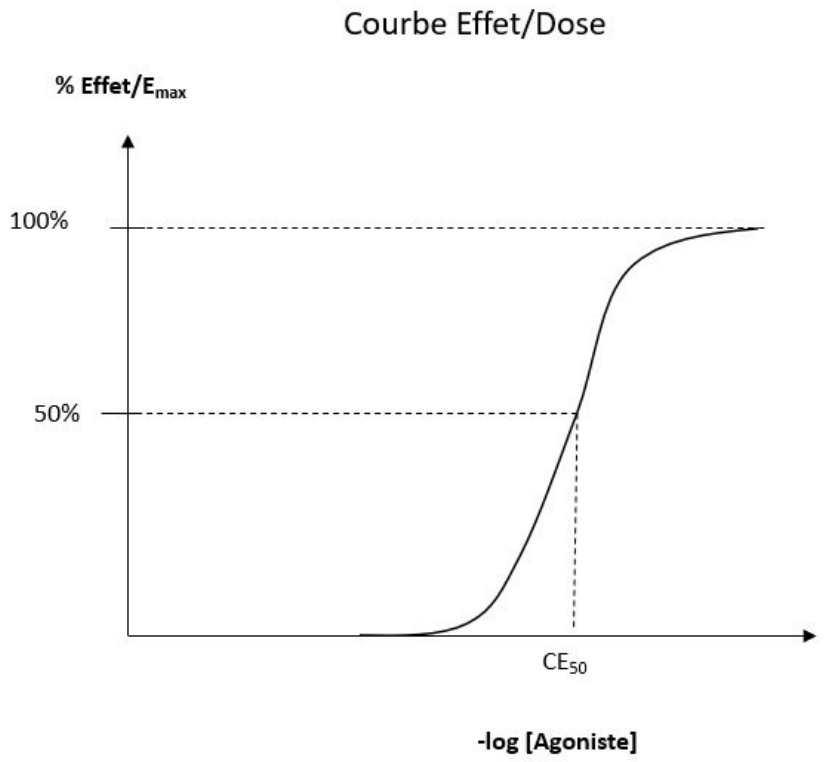


Figure 31 : courbe effet-dose (71).

La concentration de l'agoniste provoquant 50% de l'effet maximal ou EC_{50} permet d'évaluer la puissance du ligand. Plus la concentration est faible plus le ligand est puissant.

Le pourcentage d'effet maximal permet d'évaluer l'efficacité du ligand. Un ligand produisant moins de 100% de l'effet maximal est appelé agoniste partiel. Un antagoniste compétitif diminue la puissance d'un agoniste mais son efficacité est inchangée (Figure 32).

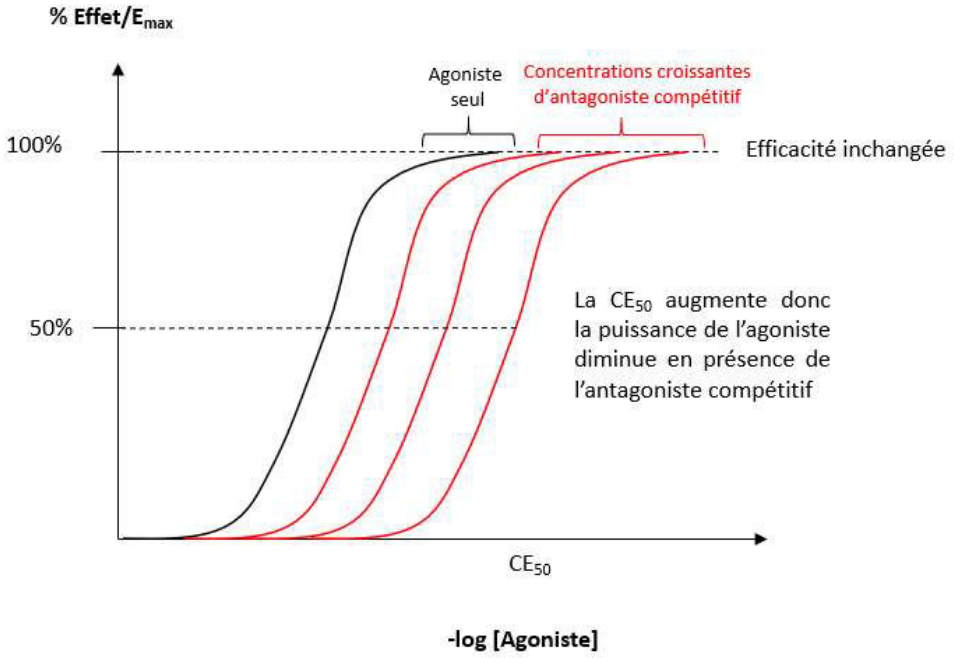


Figure 32 : effet d'un antagoniste compétitif sur la courbe effet-dose du ligand (d'après 73).

Un antagoniste non compétitif modifie son efficacité mais sa puissance est inchangée (Figure 33).

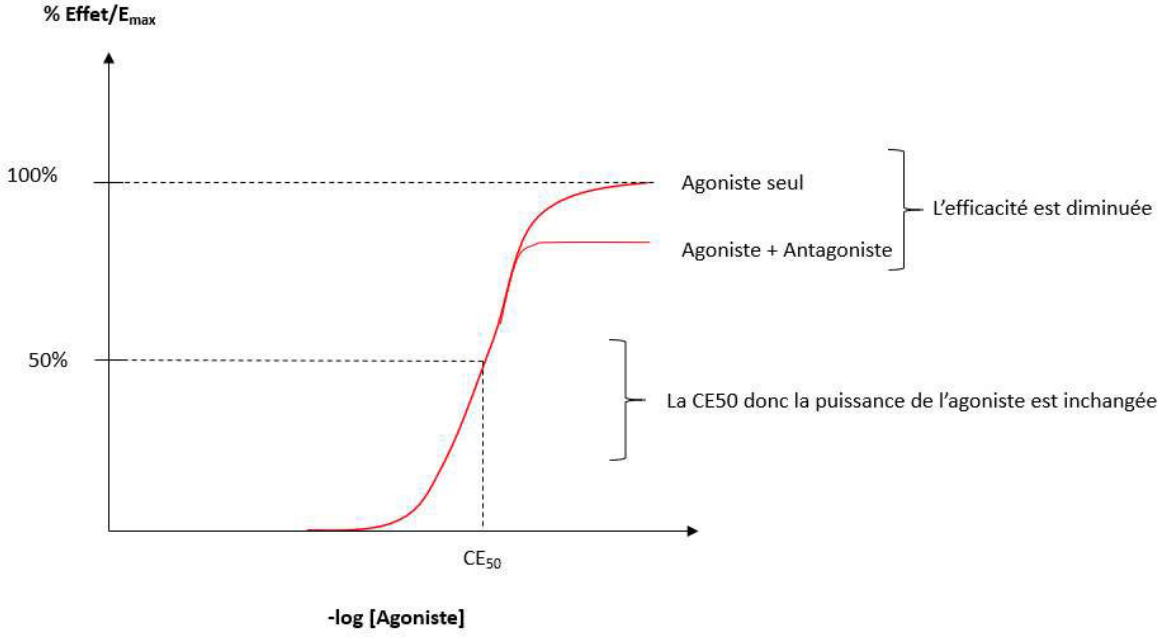


Figure 33 : effet d'un antagoniste non compétitif sur la courbe effet-dose du ligand (71).

VII. Le cas des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de protéines membranaires (72). Ces récepteurs sont ubiquitaires et occupent des fonctions clés. Les altérations de leur fonctionnement sont à l'origine de pathologies majeures. Ils font donc l'objet d'une attention particulière par la communauté scientifique notamment pour développer de nouvelles cibles thérapeutiques (73,74).

La liaison d'un ligand, entraîne une modification de conformation du récepteur responsable de son couplage. Ce couplage induit l'activation des protéines G et d'autres effecteurs tels que les arrestines à l'origine d'une activation cellulaire (75,76).

Si l'agoniste stabilise le récepteur auquel il se lie dans une conformation dite active, l'antagoniste le stabilise dans une conformation dite inactive. L'agoniste inverse stabilise une conformation inactive mais inhibe l'activité basale du récepteur (77).

Enfin, rappelons que les protéines G sont composées de sept hélices transmembranaires et d'une hélice sur la surface interne de la cellule. Les sept hélices membranaires sont connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. La diversité des récepteurs couplés aux protéines G se caractérise par la variation de tailles de boucles intra et extracellulaires (72).

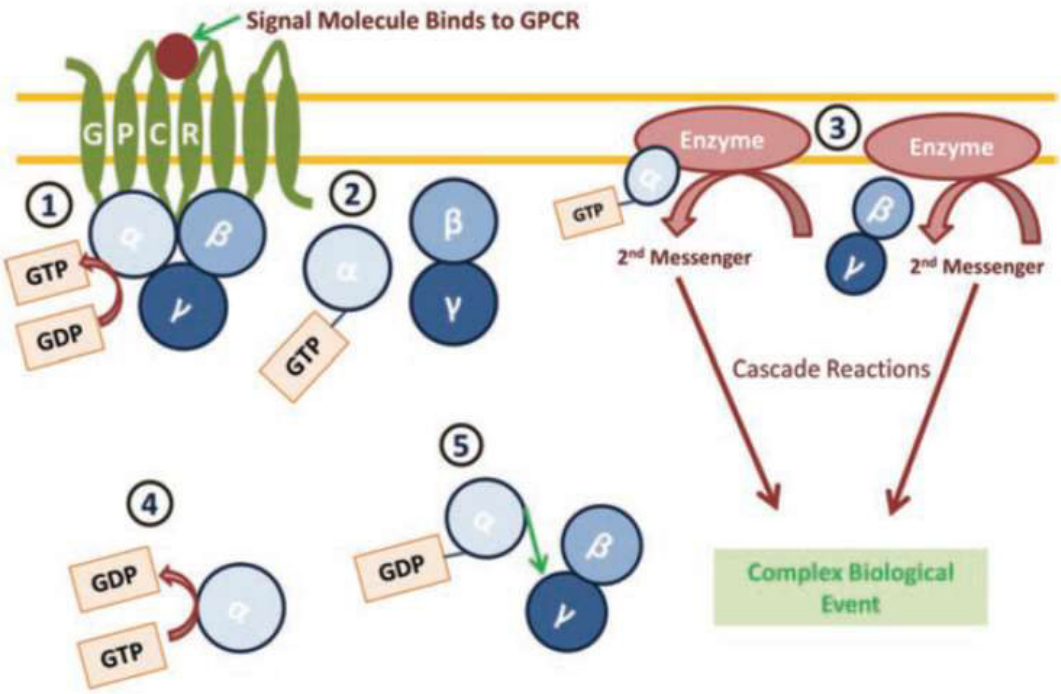


Figure 34 : cycle d'activation des protéines G (73).

CHAPITRE 3 : PROBLEMATIQUE DE LA THESE

I. L'imagerie TEP pour mesurer les fluctuations de neurotransmetteur endogène

Le cerveau est un organe complexe dont les mécanismes de neurotransmission sont peu élucidés. Les taux basals synaptiques de neurotransmetteurs sont peu connus notamment chez l'espèce humaine. En recherche fondamentale, la mesure des taux endogènes de neurotransmetteur constitue une priorité. En effet, il est d'un intérêt majeur de connaître ces valeurs dans chaque région cérébrale et leur évolution dans un contexte pathologique donné. Ces éléments apporteraient des applications notamment sur le plan thérapeutique en donnant des solutions d'approches personnalisées pour optimiser l'ajustement thérapeutique d'un patient en fonction de ses taux basals de neurotransmetteurs. La méthode historique pour estimer ces taux est la microdialyse (78). La microdialyse consiste en l'introduction stéréotaxique d'une sonde dans une zone cérébrale avec recueil en continu de liquide extracellulaire et mesures consécutives par technique micro-analytique des concentrations de neurotransmetteurs. Cette méthode est invasive et inutilisable chez l'homme (sauf rares situations en réanimation neurologique). Enfin, elle calcule une concentration synaptique (en fait une concentration extracellulaire) dans une seule région cérébrale focalisée.
Dans ce contexte, la TEP peut avoir un positionnement tout à fait original. En effet, la TEP utilise des ligands sélectifs qui peuvent entrer en compétition des neurotransmetteurs endogènes. Avec le développement des premiers radiotraceurs TEP, ce modèle de compétition a été proposé comme opportun pour réaliser une mesure indirecte des concentrations synaptiques de neurotransmetteur. Elle offre plus de transversalité que la microdialyse en s'appliquant autant sur des modèles précliniques et cliniques. Elle permet aussi d'effectuer des mesures de façon non invasive et dans toutes les régions cérébrales en une expérience.

Dans ce contexte, un objectif de la TEP est de trouver un radiotraceur idéal, sensible aux variations synaptiques d'un neurotransmetteur donné. Pour cela, des études TEP utilisent des médicaments induisant des décharges massives de neurotransmetteurs, la sensibilité du radiotraceur étant mesurée par le pourcentage de déplacement induit par le défi pharmacologique. La combinaison des pourcentages de déplacement de radiotraceurs mesurés en TEP avec les concentrations de neurotransmetteurs mesurés par microdialyse constitue la méthode de référence pour objectiver la sensibilité d'un radiotraceur à une libération de neurotransmetteur endogène.

Le système dopaminergique est le premier pour lequel on réalise chez l'homme des défis pharmacologiques en TEP et SPECT (79–81). Une découverte notable conforte l'idée que les radiotraceurs dopaminergiques sont sensibles aux variations synaptiques de dopamine : les patients schizophrènes montrent une réponse accentuée à la libération ou à la déplétion en dopamine par rapport aux contrôles (82–85). Devant ces premières observations encourageantes, une série d'études pharmacologiques par modulation des concentrations synaptiques de dopamine a conforté la sensibilité de certains radiotraceurs TEP dopaminergique (Pour revue voir (59)). Toutefois, il faut noter que l'exploration de cette modalité a montré quelques limites conceptuelles et son application à d'autres systèmes de neurotransmission que la dopamine s'est révélée plus complexe. Ces limites invitent à repenser le modèle ligand récepteur.

II. Le bouleversement du modèle ligand-récepteur

A. Variabilité de réponse des radiotraceurs à la libération de neurotransmetteur

L'exploration de la sensibilité de nombreux ligands dopaminergique montre une grande variabilité de réponse aux variations de dopamine. Théoriquement, selon le paradigme classique, l'affinité du ligand ne prédit pas la sensibilité du ligand au neurotransmetteur endogène dans l'hypothèse où les taux de neurotransmetteur sont constants pendant l'expérience et que le ligand est injecté à doses traceuses. C'est ce que l'on observe avec les ligands dopaminergiques D_2. on dénote surtout un effet « classe chimique » ; les structures dérivées des catécholamines et benzamides ont un avantage sur les butyrophénones, benzazépines (86).

Pharmacological characterizations	Ligands	Affinity (nM) (K_{high}/K_{low})	References	Lipophilicity (log P/log K_w)	References	Vulnerability endogenous DA competition
D_2 Agonist	NPA	0.4/23	95	1.79	(Waterhouse, pers. com.)[a]	Yes
	APO	0.6/127	5	1.54	(Waterhouse, pers. com.)[a]	Yes
D_2 Antagonist	Raclopride	1.2	96	1.33	108	Yes
	IBZM	0.4	97	2.78	109	Yes
	IBF	0.1	98	2.32	110	Yes
	Fallypride	0.03	99	2.43	99	Yes
	FLB457	0.02	100	1.59	111	Yes
	Epidepride	0.02	101	2.05	110	Yes
	Spiperone	0.1	102	3.65	112	No
	NMSP	0.1	103	3.32	113	No
	Pimozide	0.4	104	6.22	114	No
D_1 Agonist	SKF 82957	0.9/77	105	1.54	111	No
D_1 Antagonist	SCH 23390	0.4	106	2.50	(Foged, pers. com.)	No
	NNC 756	0.2	107	2.70	(Foged, pers. com.)	No
	NNC 112	0.2	107	3.20	(Foged, pers. com.)	No

Tableau 5 : radioligands D_1 et D_2 et expériences TEP de compétition (86).

Ainsi, on constatera que le pimozide, la N-méthyl spipérone et les radioligands D_1 ne sont pas affectés par la libération de neurotransmetteur endogène. Ces éléments invitent à questionner le modèle ligand récepteur. Théoriquement, la vulnérabilité des radiotraceurs devrait être identique d'un radiotraceur à l'autre sous les conditions évoquées précédemment. D'après le l'article de Marc Laruelle et col. ce n'est pas le cas (86). Une hypothèse pour expliquer cette discordance serait que les défis pharmacologiques effectués sont hors zone d'équilibre devant le relargage pulsatile de neurotransmetteur. Ainsi les différences de k_{off} entre ligands pourraient confondre l'estimation de la vulnérabilité de chaque traceur. Cela constitue d'ailleurs un argument pertinent pour utiliser les expériences de déplétion qui sont indépendantes de ce paramètre.

B. Notion d'effet plafond

Si une dose de 1 mg/kg d'amphétamines augmente de façon drastique (plus de 15 fois) les concentrations striatales de dopamine (87), les déplacements chez le primate (8 études) et l'humain (11 études) démontrent de façon surprenante, l'existence d'un effet plafond du déplacement (88). Autrement dit, un déplacement striatal variant de 10 à 40% pour des doses d'amphétamines variant de 0.2 à 1 mg chez le primate et 0.2 à 0.5 mg chez l'humain. L'effet plafond est observé avec deux radiotraceurs antagonistes, le [^{11}C]raclopride et le [^{123}I]IBZM. L'existence de cet effet plafond dénote les premières limites du modèle ligand récepteur. Il indique en effet que seul 40% des récepteurs seraient liés par l'antagoniste dopaminergique. Les mesures de déplacements *in vivo* apparaissent incohérentes avec le modèle théorique proposé qui suggère la liaison du radiotraceur sur une population homogène de récepteurs.

Ce bouleversement de paradigme est évoqué dans l'article de revue fondatrice écrite par Marc Laruelle en 2000 (89). L'hypothèse avancée pour expliquer ces différences prend sa source dans des données *in vitro*. Elle s'applique aux récepteurs couplés aux protéines G. Elles indiquent l'existence de deux types de sites de liaison (Figure 35) (pour revue voir (90,91)). Un agoniste se lie à des sites de haute affinité situés sur les récepteurs fonctionnels couplés aux protéines G. Il entre directement en compétition avec le neurotransmetteur endogène qui est lui-même agoniste. Un antagoniste se fixe sur des sites de basse affinité présents à la fois sur les récepteurs couplés et non couplés aux protéines G. Ainsi lors d'une expérience de compétition, le radiotraceur antagoniste est chassé par le neurotransmetteur endogène uniquement sur les sites de haute affinité. Après stimulation pharmacologique, il persiste une liaison résiduelle sur les récepteurs non couplés. Ceci pourrait expliquer l'effet plafond observé lors du déplacement des radiotraceurs antagonistes [^{11}C]raclopride et le [^{123}I]IBZM.

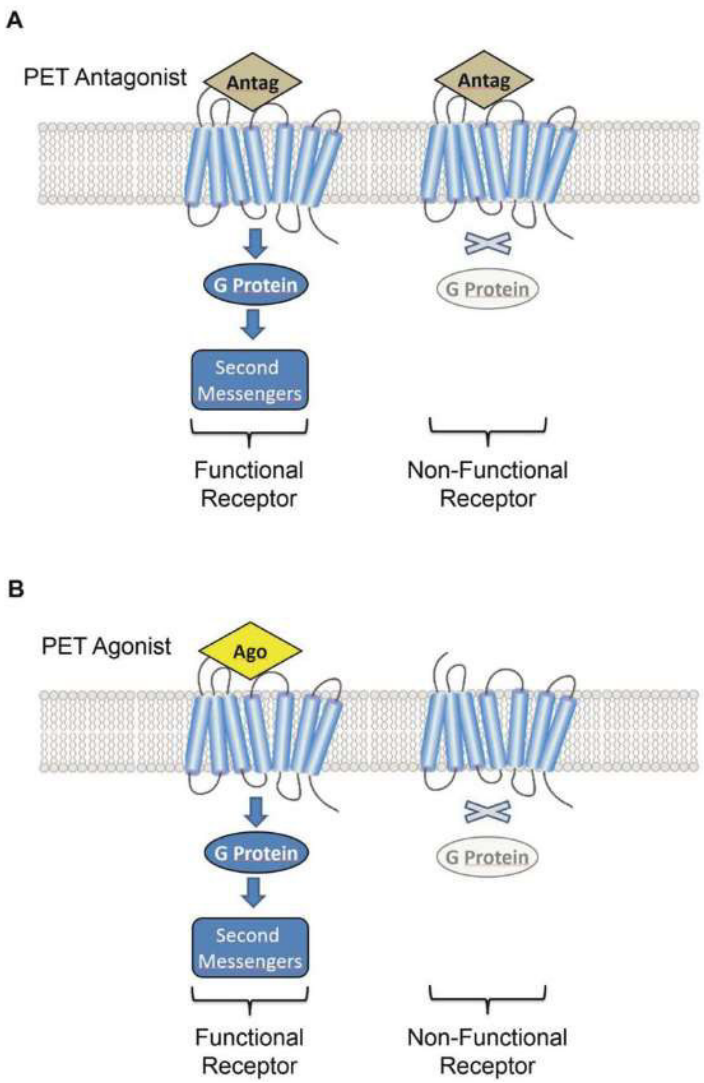


Figure 35 : modalités de liaison des radiotraceurs agonistes et antagonistes des protéines couplées aux protéines G (92).

Le radiotraceur agoniste ne se liant que sur les sites de liaison du neurotransmetteur endogène, on s'attend lors d'un défi pharmacologique à un déplacement total du radiotraceur reflet de la proportion de récepteurs couplés. Cette différence de propriété intrinsèque entre agoniste et antagoniste donne une opportunité de mesurer in *vivo* la proportion de récepteurs couplés et non couplés. Lors d'un challenge pharmacologique, le radiotraceur antagoniste permet d'estimer la proportion de récepteurs non couplés, le radiotraceur agoniste estime la proportion de récepteurs couplés. Ainsi, la compétition directe de l'agoniste avec le neurotransmetteur endogène laisse supposer une meilleure sensibilité de ce dernier dans la stimulation pharmacologiques en TEP. Ces concepts pharmacologiques invitent à repenser le modèle de liaison ligand récepteur (Figure 36).

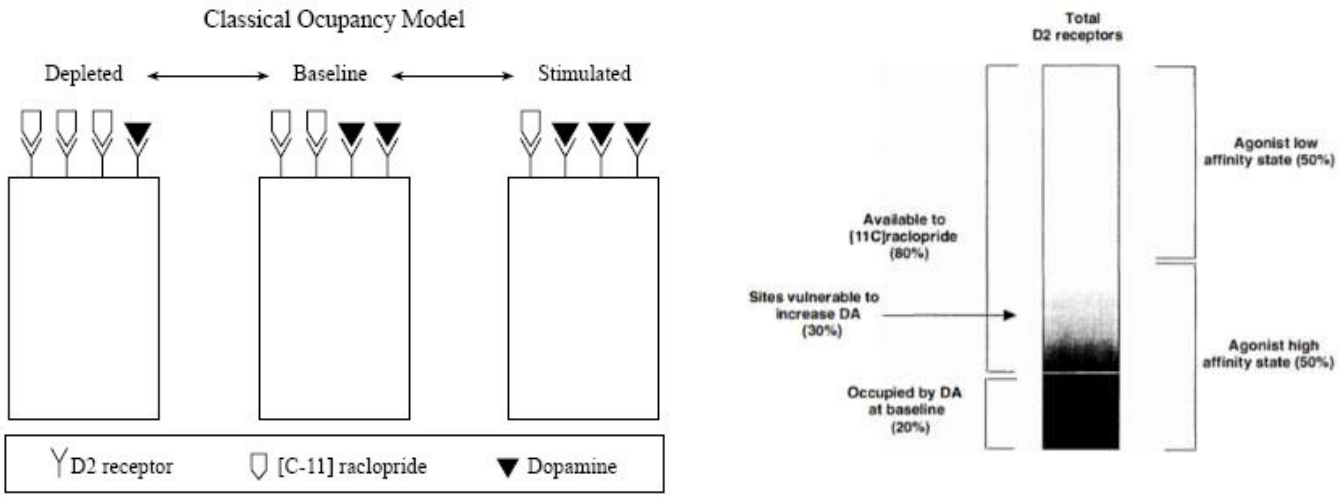


Figure 36 : ancien modèle et nouveau modèle proposé pour les récepteurs dopaminergiques. Le radiotraceur agoniste [^{11}C]NPA se lie au récepteurs de haute affinité et entrent en compétition directement avec la dopamine. L'antagoniste [^{11}C]raclopride se lie aux récepteurs de haute affinité et de basse affinité (89).

A titre d'exemple, les premières études de couplage TEP et microdialyse, montrent une relation linéaire entre le pourcentage de déplacement de radiotraceur et les concentrations de dopamine avec le [^{11}C]raclopride et le [^{123I}]IBZM (86). Avec ces antagonistes, on montre qu'une augmentation de 40% et 44% de dopamine endogène modifie uniquement de 1% le signal TEP avec le [^{11}C]raclopride et le [^{123}I]IBZM respectivement. Une autre étude montre une sensibilité accrue de l'agoniste [^{11}C]NPA par rapport au deux antagonistes [^{11}C]raclopride et au [^{123}I]IBZM (Figure 37) (88). Ceci vient conforter les concepts théoriques cités plus haut.

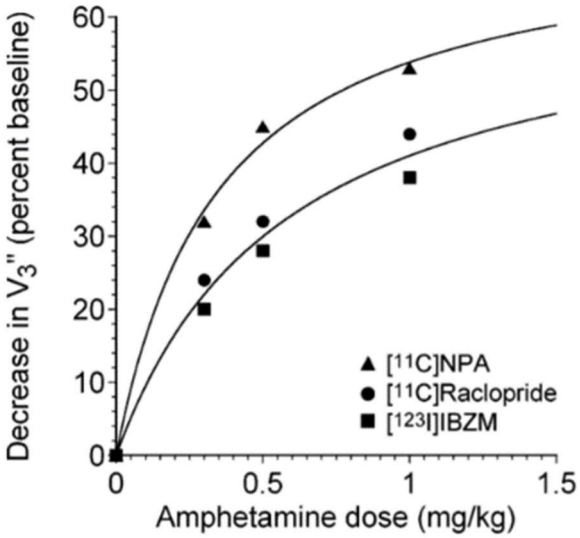


Figure 37 : variations de liaison de trois radiotraceurs dopaminergiques en fonction de doses croissantes d'amphétamine (88).

C. La notion de retour à l'état basal partiel

Les défis pharmacologiques réalisés avec les traceurs [^{123}]IBZM et le [^{11}C]raclopride montrent une incohérence temporelle entre les données de microdialyse et de TEP ou SPECT. En effet, les mesures de microdialyse après injection d'amphétamines indiquent une cinétique très rapide d'entrée et d'élimination de neurotransmetteur dans le milieu extracellulaire. Ces données ne sont pas cohérentes avec la cinétique du radiotraceur [^{123}I]IBZM qui montre une diminution longue et prolongée du signal (93). Les amphétamines induisent un pic entre 10 et 20 minutes puis les taux de dopamine reviennent rapidement à un taux représentant 34% de l'état basal à 120 minutes. La liaison spécifique du radiotraceur diminue pendant 60 à 90 minutes pour le [^{123}I]IBZM et 40 à 60 minutes pour le [^{11}C]raclopride. La cinétique se stabilise à un niveau plus bas que son niveau basal. Théoriquement, on devrait s'attendre à une réassociation du radiotraceur après compétition avec la dopamine avec un retour à la moitié du niveau basal de la liaison en 120 minutes (94).

Si on peut aisément imputer la cinétique retardée des traceurs par leur dissociation lente, l'atteinte d'un nouvel état d'équilibre post défi pharmacologique différent de l'état basal est sujet à interrogations. Ces données indiquent que les changements de liaison spécifique des radiotraceurs ne sont pas directement liés au changement des taux d'occupation de dopamine sur les récepteurs D_2. Une hypothèse suggérée est l'existence de mécanismes annexes des amphétamines. Ces dernières seraient responsables d'une occupation de la dopamine plus importante que l'occupation initiale pré-défi pharmacologique. On expliquerait donc une liaison amoindrie des radiotraceurs dopaminergiques post-expérience. Au-delà de l'inhibition du DAT, elles inhibent de la monoamine oxydase (95) et stimulent la synthèse de dopamine (96). Dans un premier temps, le blocage du DAT serait prédominant. A distance, les deux effets cités plus haut prendraient leur importance. La microdialyse mesurant uniquement les taux extrasynaptiques de dopamine, elle ne permet pas à elle seule de déceler les flux de dopamine intra- et extrasynaptiques. C'est pourquoi les mécanismes annexes évoqués ne peuvent pas être mis en évidence par cette technique.

Une autre hypothèse est l'existence au niveau cellulaire de phénomènes médiés par l'action agoniste de la dopamine et qui entraîneraient une réorganisation du nombre de récepteurs à la surface des cellules. Ces phénomènes bien décrits *in vitro* sont notamment la « down régulation » induite par la liaison agoniste, l'internalisation des récepteurs et la phosphorylation (Pour revue, voir(97)). Ils induiraient une diminution de sites de liaison disponible à la surface des cellules et donc, un retour de la liaison du radiotraceur à un état inférieur à l'état basal.

D. Le cas de la spipérone et des récepteurs dopaminergiques D_1.

Les données de stimulations pharmacologiques sur rats et primates démontrent des effets paradoxaux pour certains radiotraceurs: à titre d'exemple un défi par amphétamine induit une augmentation de la liaison du [^{18}F]NMSP (98). Les données obtenues chez le rongeur avec son dérivé tritié, la [^{3}H]spipérone, indiquent qu'une déplétion de dopamine par réserpine diminue la liaison du radiotraceur (99). L'une des hypothèses avancée pour expliquer ces observations serait une internalisation des récepteurs médiés par la dopamine (agoniste), qui expliquerait une augmentation d'affinité apparente dans les stimulations pharmacologiques par amphétamines et donc une augmentation apparente de la liaison spécifique. Ce concept d'internalisation est aussi avancé pour expliquer les effets paradoxaux obtenus avec les radiotraceurs D_1.

III. Vers l'émergence d'un nouveau modèle pharmacologique

Les développements des premiers radiotraceurs dopaminergiques et les premières études de vulnérabilité pharmacologique des radiotraceurs à la libération de neurotransmetteur ont mis en évidence des phénomènes non expliqués par le modèle classique ligand récepteur. Ces données contrastées ont invité à formuler des hypothèses issues de certains concepts *in vitro* biens étayés avec les protéines G (internalisation médiée par les agonistes, couplage des récepteurs). Comme vu plus haut, l'ensemble des phénomènes décrits semblent le fait des agonistes. L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer dans quelle mesure des radiotraceurs en leur qualité d'agoniste peuvent revisiter la neuropharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G. Plus précisément, dans quelles mesures les propriétés *in vitro* des protéines G médiées par les agonistes ont un impact en imagerie TEP? Quelles nouvelles applications ces propriétés confèrent-elles aux radiotraceurs agonistes ?

Dans un premier chapitre nous proposons de répondre à cette question sous la forme d'une revue de la littérature que nous avons menée.

Dans un second temps, nous proposons d'apporter une réponse expérimentale grâce à nos explorations radiopharmacologiques du radiotraceur agoniste 5-HT_{1A}, le [^{18}F]F13640.

CHAPITRE 4: LA PLACE DES AGONISTES TEP DANS LA NEUROIMAGERIE, REVUE DE LA LITTERATURE

I. Introduction

Notre recherche bibliographique a été effectuée du mois de mai 2017 à novembre 2017. La stratégie de recherche s'est centrée sur la base de données PubMed Medline. L'équation utilisée est la suivante : « PET AND Agonist AND Brain ». Elle a identifié 516 articles de recherche. La méthode dite de « snow balling », à savoir le recrutement de radiotraceurs agonistes notifiés dans les articles et non directement dans la recherche initiale, a été utilisée. Etant donné le faible nombre de radiotraceurs agonistes des protéines G, une recherche élargie à tous les récepteurs a été privilégiée. Au terme du travail de repérage des radiotraceurs, seuls les agonistes des protéines G ont été sélectionnés. Dans un souci de clarté, seuls les traceurs passés chez l'homme ont été exhaustivement décrits selon un plan chronologique. Les autres radiotraceurs non passés chez l'homme mais dont le développement préclinique a été jugé concluant sont évoqués dans l'appendice de l'article.

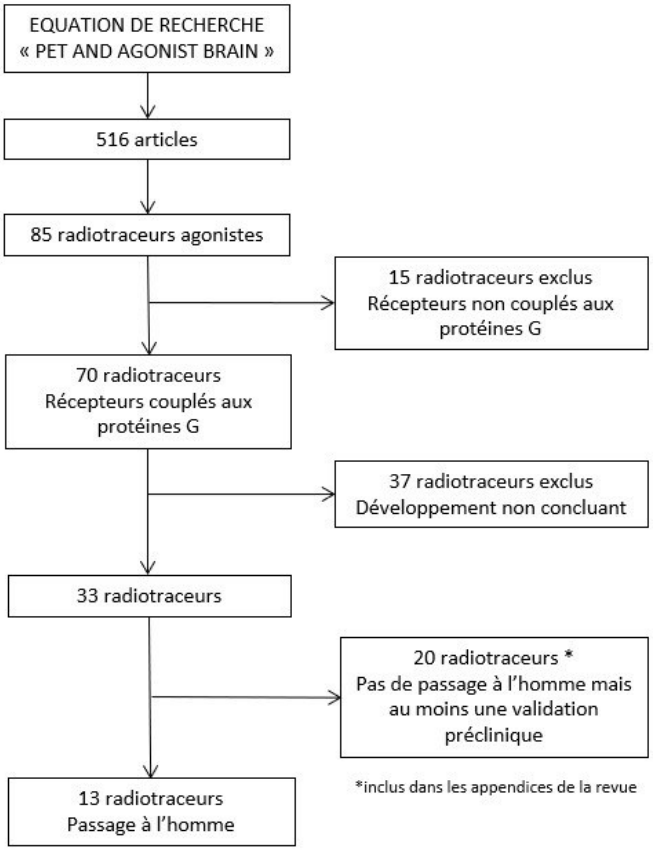


Figure 38 : résumé de notre stratégie de recherche bibliographique.

II. Discussion

La revue (dans sa forme publiée, ci-après) a pour objectif de démontrer l'intérêt de comparer l'imagerie TEP obtenue par un antagoniste avec celle obtenue avec un agoniste. En effet, comme évoqué plus haut, il est possible de mesurer la proportion de récepteurs couplés et non couplés pour un récepteur donné. On s'attend alors à retrouver un potentiel de liaison supérieur pour l'antagoniste. Si ce type d'observation a pu être mise en évidence pour les récepteurs dopaminergiques de type 2 (100) et sérotoninergiques de sous type 1A (101), l'exploration d'autres récepteurs montre qu'il existe certaines limitations pratiques à prendre en compte.

Premièrement, les potentiels de liaisons sont le reflet de l'indice B_{max}/K_D . Si le K_D de chaque radiotraceur est bien connu *in vitro*, elle peut être différente *in vivo*. Cela remet en cause la comparaison de deux indices de liaison, l'un estimé par un radiotraceur antagoniste et l'autre estimé par un radiotraceur agoniste. L'analyse par Scatchard du [^{11}C]PHNO et du [^{11}C]raclopride ne montre pas de différence dans l'estimation du B_{max}. Il existe donc des discordances *in vivo* dans l'estimation du couplage des récepteurs. Une hypothèse pour expliquer cette discordance serait le manque de sélectivité du [^{11}C]PHNO. Ce dernier a une affinité supérieure pour les récepteurs D_3 que pour les récepteurs D_2. Les modifications de liaison seraient donc plus influencées par celles des récepteurs D_3. Cet élément introduit donc un biais de confusion dans l'analyse des résultats. Ces hypothèses ont notamment été suggérées lors de l'exploration des systèmes opioïdes et sérotoninergiques.

Ensuite, chaque radiotraceur possède sa propre cinétique de liaison et de dissociation de son récepteur. Ces différences ont un impact sur l'estimation du potentiel de liaison de chaque radiotraceur et, par conséquent, peuvent biaiser le calcul de la proportion de récepteurs couplés. Cette discordance cinétique est d'autant plus flagrante lorsque l'on compare agoniste et antagoniste. En effet, la conformation active des récepteurs aux protéines G induit une dynamique spécifique à la surface des cellules et influence indirectement la cinétique du radiotraceur agoniste (102).

Enfin, les concentrations basales de neurotransmetteurs rapprochent les estimations du $B_{available}$ des radiotraceurs antagonistes et agonistes. Cela diminue les chances de mesurer le couplage des récepteurs.

Au total, il existe des limites *in vivo* pour utiliser pleinement la signature des radiotraceurs agonistes en neuropharmacologie. Ces limites se surajoutent à l'anesthésie qui constitue un facteur confondant applicable à tous les radiotraceurs en neuropharmacologie.

Toutefois, il apparaît crucial de confronter les données agonistes/antagonistes en TEP pour faire évoluer le paradigme ligand récepteur. Il existe encore peu d'articles scientifiques qui confrontent les données issues des deux types de ligands. Par ailleurs, la synthèse proposée fait apparaître que le radiotraceur agoniste est un outil de choix sensible au neurotransmetteur endogène. Si le système

dopaminergique se prête bien aux expériences de libération de neurotransmetteur, les autres systèmes endogènes montrent plus de limitations intrinsèques telles que la proportion de récepteurs disponible, les taux basals de neurotransmetteurs endogènes, la proportion de récepteurs couplés (103). Ces limites constituent aussi celles du modèle ligand récepteur. L'utilisation de radiotraceurs agonistes fait émerger des concepts *in vitro* qui contribuent à faire évoluer le modèle. Le concept d'internalisation des récepteurs est une hypothèse fréquemment retrouvée pour expliquer les différences agonistes antagonistes. Il se pose la question de la cinétique d'action de ce phénomène en marge du processus classique de liaison du radiotraceur (89).

Au-delà des hypothèses évoquées par Marc Laruelle pour évoquer les discordances du paradigme ligand récepteur, notre revue met en évidence le concept d'agonisme biaisé, principe selon lequel un agoniste peut activer une cascade de transduction parmi les nombreuses existantes (104–106). Autrement dit, chaque récepteur présente une multiplicité conformationnelle propre au profil de chaque agoniste qui l'active. Cette multiplicité est notamment mise en évidence par l'étude structurelle des récepteurs par cristallographie (72) . On passe donc du concept un récepteur-une fonction à un récepteur-une multiplicité de fonctions sélectionnées activées par un agoniste précis. L'utilisation de radiotraceurs agonistes ouvre donc la voie de la pharmacologie fonctionnelle : le radiotraceur reflète non seulement une proportion de récepteur mais une population de récepteurs actifs pour une sous-fonction d'un récepteur aux protéines G. Autrement dit, chaque agoniste porte sa propre signature fonctionnelle. Cela ouvre la perspective de les utiliser comme outil d'imagerie fonctionnelle. La TEP n'est plus seulement un outil qui 'photographie' un état, elle permet la visualisation de la fonctionnalité d'un système de neurotransmission. Cette approche invite à repenser la pharmacologie des protéines G et les stratégies en recherche et développement (73,107–110). En effet, on s'oriente vers une pharmacologie de précision (111).

III. Conclusion

Les différences observées entre agonistes et antagonistes sur les modalités de liaison aux récepteurs cérébraux en TEP ont permis de faire évoluer le paradigme du modèle ligand-récepteur. La construction d'un modèle plus élaboré se base sur des données *in vitro* démontrées. Les notions de couplage des protéines G, d'internalisation, d'agonisme biaisé, permettent d'expliquer certains phénomènes que l'on observe lorsque l'on pratique des expériences de compétition. Toutefois, il existe encore des zones d'ombres qui ne permettent d'expliquer ce que l'on observe *in vivo*. Le schéma ci-dessous récapitule l'apport des radiotraceurs agonistes tant en termes de modalités TEP qu'en termes d'application.

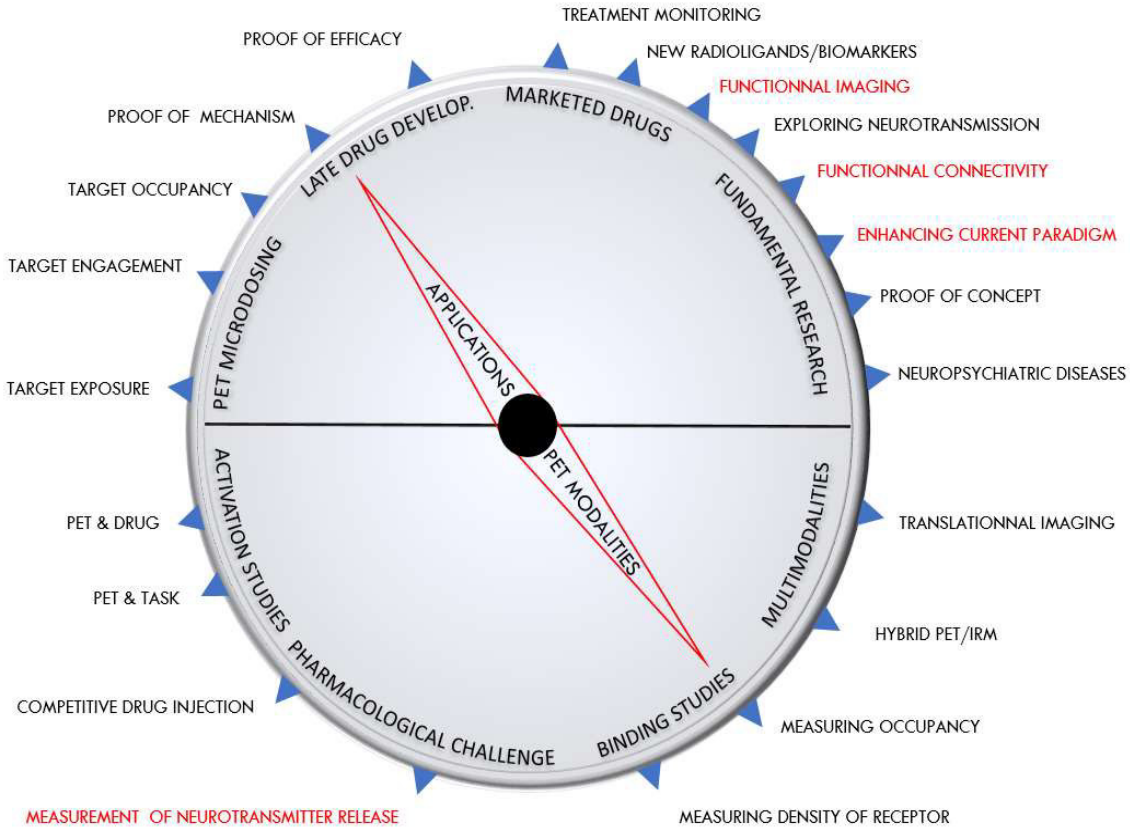


Figure 39 : schéma récapitulant les modalités TEP existantes et leurs applications. Les zones en rouge identifient les rôles attribués aux radiotraceurs agonistes.

IV. Article

frontiers in Molecular Neuroscience

REVIEW
published: 18 October 2019
doi: 10.3389/fnmol.2019.00255

Is There a Role for GPCR Agonist Radiotracers in PET Neuroimaging?

*Matthieu Colom[1,2], Benjamin Vidal[1] and Luc Zimmer[1,2,3]**

[1] Lyon Neuroscience Research Center, INSERM, CNRS, Université de Lyon, Lyon, France, [2] CERMEP, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, [3] Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France

Positron emission tomography (PET) is a molecular imaging modality that enables *in vivo* exploration of metabolic processes and especially the pharmacology of neuroreceptors. G protein-coupled receptors (GPCRs) play an important role in numerous pathophysiologic disorders of the central nervous system. Thus, they are targets of choice in PET imaging to bring proof concept of change in density in pathological conditions or in pharmacological challenge. At present, most radiotracers are antagonist ligands. *In vitro* data suggest that properties differ between GPCR agonists and antagonists: antagonists bind to receptors with a single affinity, whereas agonists are characterized by two different affinities: high affinity for receptors that undergo functional coupling to G-proteins, and low affinity for those that are not coupled. In this context, agonist radiotracers may be useful tools to give functional images of GPCRs in the brain, with high sensitivity to neurotransmitter release. Here, we review all existing PET radiotracers used from animals to humans and their role for understanding the ligand-receptor paradigm of GPCR in comparison with corresponding antagonist radiotracers.

Keywords: radiopharmaceutical, receptor, agonist, Positron emission tomography (PET), neuroimaging

OPEN ACCESS

Edited by:
Philippe De Deurwaerdere, Université de Bordeaux, France

Reviewed by:
Diana Martinez, Columbia University, United States
Hartmut Lüddens, Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

***Correspondence:**
Luc Zimmer
luc.zimmer@univ-lyon1.fr

***Received:** 25 July 2019*
***Accepted:** 02 October 2019*
***Published:** 18 October 2019*

Citation:
Colom M, Vidal B and Zimmer L (2019) Is There a Role for GPCR Agonist Radiotracers in PET Neuroimaging? Front. Mol. Neurosci. 12:255. doi: 10.3389/fnmol.2019.00255

INTRODUCTION

From Agonist Molecules to PET Radiopharmaceuticals

Positron emission tomography is a molecular imaging modality that enables exploration of metabolic processes *in vivo*. It uses specific radiotracers for specific molecular targets (Van de Bittner et al., 2014). The radiotracer must have several characteristics (Halldin et al., 2001; Pike, 2009; Honer et al., 2014): i.e., a specific binding to the target of interest with an acceptable signal-to-noise ratio, a passage through the BBB, and limited radiometabolites in the brain. The most

Abbreviations: μ Opioid Receptors, mu opioid receptors; $mGlu_1$, metabotropic glutamate receptor 1; ^{11}C, carbon-11; ^{18}F, Fluor-18; 1TCM, one-tissue compartmental model; 2TCM, two-tissue compartmental model; 5-HT, serotonin; $5\text{-}HT_{1A}$, subtype 1A of serotonin receptors; $5\text{-}HT_{1B}$, subtype 1B of serotonin receptors; $5\text{-}HT_{2A}$, subtype 2A of serotonin receptors; $5\text{-}HT_{2C}$, subtype 2C of serotonin receptors; $5\text{-}HT_4$, subtype 4 of serotonin receptors; $5\text{-}HT_7$, subtype 7 of serotonin receptors; 6-OH-DA, 6 hydroxy-dopamine; A_1 Receptor, subtype 1 of adenosine receptors; A_{2A} Receptor, subtype 2A of adenosine receptors; Ach, acetylcholine; AChEI, acetylcholinesterase inhibitors; AD, Alzheimer's disease; APOE-e4, apoenzyme 4; B_{avail}, available density of receptors; BBB, blood–brain barrier; B_{max}, maximal density of receptors; BP, binding potential; BP_{ND}, non-displaceable binding potential; BPP, plasma binding potential; CB_1, subtype 1 of cannabinoid receptors; CNS, central nervous system; D_2, type 2 dopaminergic receptors; D_3, type 3 dopaminergic receptors; E_{max}, maximal effect; $GABA_B$, subtype B of GABA receptors; GPCRs, G-protein-coupled-receptors; GTP, guanosine triphosphate; H_3 receptors, subtype 3 of histamine receptors; IC_{50}, half-maximal inhibitory concentration; Kd/Ki, affinity of receptors; KO, knock-out; LSD, diethylamide lysergic acid; M_1R, type 1 of muscarinic receptors; M_2R, type 2 of muscarinic receptors; M_3R, type 3 of muscarinic receptors; M_4R, type 4 of muscarinic receptors; nor-BNI, norbinaltorphimine; PET/fMRI, Positron emission tomography/functional magnetic resonance imaging; PET, Positron emission tomography; PgP, P glycoprotein; SRTM, simplified tissue reference model; κ Opioid Receptors, kappa opioid receptors; σ_1, sigma 1 receptors.

common molecular targets in PET neuroimaging are neurotransmitter receptors or transporters. PET imaging visualizes various neuroreceptors that can be located *in vivo* on presynaptic and/or post-synaptic sites, using a microdose of radioligand (i.e., tracer dose). PET imaging is therefore a powerful tool to demonstrate changes in neurotransmission in various CNS disorders, and can be used translationally in both animal models and humans. In addition to its contribution to the understanding of pathophysiological processes, PET imaging plays an important role in CNS drug development. It enables measurement of the proportion of receptors occupied by pharmacological doses of drugs of interest, in competition with a suitable radioligand specific to the same target. It can thus demonstrate brain penetration and *in vivo* binding to the target, which can be correlated to plasma concentrations to predict the effective dose range for clinical studies. They collect important information about the bioavailability of the drug candidate and contribute to the demonstration of brain penetration. Microdosing and drug occupancy studies have been shown to be very valuable for optimizing the development of drugs targeting the CNS. Another important application of PET neuroimaging is to measure *in vivo* fluctuations in endogenous neurotransmitter release. According to the occupancy model, the binding potential of a given radiotracer is modulated by the local concentration of the endogenous neurotransmitter in competition for the same receptors when the affinities of radioligand and neurotransmitter are in the same order of magnitude (Laruelle, 2000). All these applications rely on the development and full characterization of specific radiotracers. Consequently, although PET imaging provides interesting *in vivo* approaches to understanding neuropharmacology, it is currently limited by a lack of specific radiotracers for many known brain receptors. Moreover, the large majority of available radiotracers are antagonists and, as will be explained below, may not provide information about GPCR functional status *in vivo*; this fact, often disregarded, may be an important limitation for the interpretation of numerous clinical PET studies and probably explains certain controversies still ongoing in the field. The present review will therefore focus on the few agonist radiotracers that are currently available, highlighting their potential interest in PET neuroimaging, especially in humans in the form of radiopharmaceuticals.

The Pharmacological Paradigm of G Protein-Coupled Receptor Agonism

In vitro studies on membrane homogenates distinguished different properties in GPCR agonists and antagonists. While antagonists bind to receptors with a single affinity, agonists show two different affinities: high affinity for receptors coupled to G-proteins, and low affinity for uncoupled receptors (**Figure 1**). As reviewed recently (Shalgunov et al., 2019), these findings were demonstrated for various GPCRs: adrenergic (Hoffman and Lefkowitz, 1980), dopaminergic (Sibley et al., 1982; Leff et al., 1985), serotonergic (Battaglia et al., 1984; Gozlan et al., 1995; Watson et al., 2000) muscarinic (Ehlert, 1985), cannabinoid (Gullapalli et al., 2010), and opioid receptors (Law et al., 1985). The pharmacology of high-affinity receptors features specific phenomena: negative GTP cycle feedback loop, oligo-heterodimerization, internalization. While many *in vitro* studies revealed dysregulation of the balance between coupled and uncoupled states in these receptors, the implications for neurological disorders remains to be demonstrated, and new tools are needed. At present, few GPCRs can actually be studied using both antagonist and agonist radiotracers. Thus the different functional states of the receptors *in vivo* cannot be distinguished, making it impossible to specifically study the receptors in the high-affinity state which must represent the true (synapse) responsivity of the system to endogenous neurotransmission. Given that agonists bind preferentially to coupled receptors, PET imaging could disclose the active state of a receptor population.

Antagonists Are Often Used in PET Neuroimaging

The primary reason was that radiochemists and radiopharmacologists had access to a larger choice of antagonist molecules, initially developed as neuropharmacological tools; but there are also other reasons. Firstly, in terms of pharmacology, it is simpler to use an antagonist, which has only one affinity for a given receptor, as it does not discriminate between different subpopulations but rather provides an image of the global density of receptors. In contrast, using an agonist complicates the analysis due to its dual affinity for both high- and low-affinity receptors, providing an image with lower signal-to-noise ratio due to the lower density of the targeted receptors. Moreover, agonists are more likely to induce undesirable side effects for the patient if the quantity injected is too great (i.e., higher than a tracer dose): the specific activity needs to be high enough for a microdose of agonist to be injected, at subpharmacological level. Another problem is that the rate of conversion from high- to low-affinity state can cause the agonist to dissociate from its receptor too quickly: after stimulation by the agonist, the receptor is likely to switch to the low-affinity state within seconds (Mathis et al., 1997). Although dissociation is slower than the conversion from high- to low-affinity state, this can cast doubt on the functional state of the receptors actually targeted by the agonist (Seeman, 2012). All these reasons explain why PET neuroimaging using agonist radiotracers is considered challenging, as it raises a number of difficulties relating to radiopharmacy (e.g., the potential pharmacological effects of the radioligand if the specific activity is too low), or to pharmacological concepts that are not at present fully elucidated, such as the conformational model of GPCR signaling itself. In fact, GPCRs can be considered as either pre-coupled to their respective G proteins or not (De Lean et al., 1980; Kent et al., 1980; Mongeau et al., 1992), or as initially non-coupled and interacting with G proteins after agonist stimulation (Laruelle, 2000; Skinbjerg et al., 2010).

Agonist Radiotracers to Explore the Coupling of GPCRs

On the other hand, the fact that neuroimaging mainly uses antagonist radiotracers incurs a number of limitations, in terms of both neurophysiology and pathophysiology. For

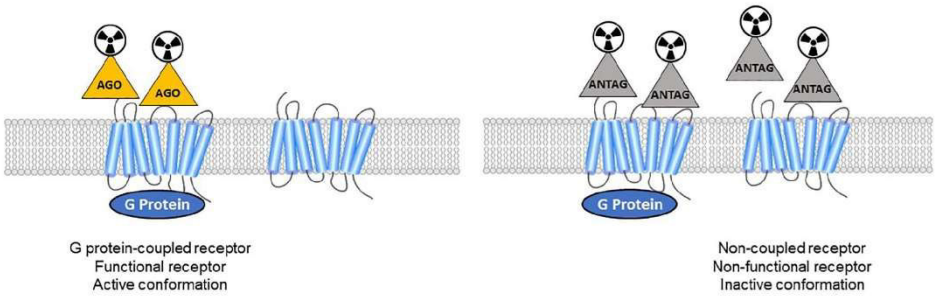


FIGURE 1 | Antagonist radioligands bind both coupled and non-coupled GPCRs with the same affinity. Agonist radioligands discriminate high-affinity (active GPCRs) versus low-affinity sites (inactive receptors).

neurophysiological exploration, the lack of sensitivity to endogenous neurotransmitter level or exogenous agonists at pharmacological dose, as will be discussed below, calls for the use of agonist radioligands. The physiological impact of GPCR functional state plays a major role in maintaining cellular homeostasis and effective neurotransmission. Compared to ion channels, which produce relatively simple and quick responses after stimulation by a ligand, GPCR signaling involves complex signaling cascades with production of numerous secondary messengers, interaction with various channels (Reboreda et al., 2018) and phosphorylation of diverse proteins, which may have varying long-term effects in the cell. Therefore, GPCRs are of critical functional importance in the CNS and are one of the most important drug targets in pharmacology, and especially neuropharmacology (Albizu et al., 2010; Björk and Svenningsson, 2011; Jastrzebska et al., 2011; Hauser et al., 2017). The same GPCR can interact with multiple signaling pathways that may vary across the brain [e.g., 5-HT_{1A} receptors (la Cour, 2006)]. For example, according to the recent concept of biased agonism, each ligand may preferentially stimulate a few of the numerous pathways that can interact with a GPCR. This may explain the diverse pharmacological effects observed for a given class of GPCR ligands (Albizu et al., 2010). The complexity of GPCRs needs to be studied more extensively *in vivo*, and requires the development of suitable tools such as agonist radiotracers and, ultimately, biased agonists. Pathophysiologically, G protein signaling is strongly involved in many neurodegenerative or neuropsychiatric disorders (Schreiber and Avissar, 2000; Avissar and Schreiber, 2006; Thathiah and De Strooper, 2011; Heese, 2013). Numerous *in vitro* studies showed that GPCR coupling state is modified in pathological conditions (Schreiber et al., 2009; Becker et al., 2014; Vidal et al., 2016). The exploration of coupled and non-coupled populations of receptors *in vivo* could be a key point in developing new therapies, monitoring treatment effects and identifying treatment responders. At present, it is difficult to explore G protein coupling in the brain *in vivo* due to a lack of non-invasive tools; it is measured either on brain slices *in vitro* (Pejchal et al., 2002; Shen et al., 2002) or in peripheral cells such as leukocytes (Golan et al., 2011).

According to *in vitro* pharmacological findings, agonist radiotracers may provide new tools, challenging the standard ligand receptor model in pharmacology (Laruelle, 2000). They seem to be involved in GPCR activity and reflect the responsiveness of the synapse signaling system (Shalgunov, 2017). Therefore, agonist radioligands could provide precise *in vivo* pharmacology by imaging only active neuroreceptors (Zimmer, 2016). PET would thus seem to be the means to shed light on GPCR properties *in vivo*.

STATE OF THE ART OF EXISTING PET AGONIST RADIOTRACERS FOR NEUROIMAGING

The following section comprises an exhaustive review of PET radiotracers with a translation to first in human are presented (**Figure 2** and **Table 1**). See **Supplementary Material** for exhaustive review.

Dopaminergic Receptors

The dopaminergic system has five formally described subtypes of receptors (D_1, D_2, D_3, D_4, D_5). The dopaminergic system has benefited from the development of a large number of PET radiotracers. The majority of these radiotracers are derived from the many pharmacological tools and drug candidates that have been developed for psychiatry and then neurology. Among these, the use in humans of three agonist radiotracers of D_2/D_3R, allowed to investigate sensitivity to neurotransmitter release and estimate the proportion of coupling in comparison with the reference antagonist radiotracer, [^{11}C]raclopride.

D_2/D_3 Receptors

[^{11}C]NPA

Ernst (1967) reported that apomorphine interacted with dopamine receptors. This observation launched intensive research about apomorphine's structure/activity relationship, to define precisely the pharmacophore enabling dopamine

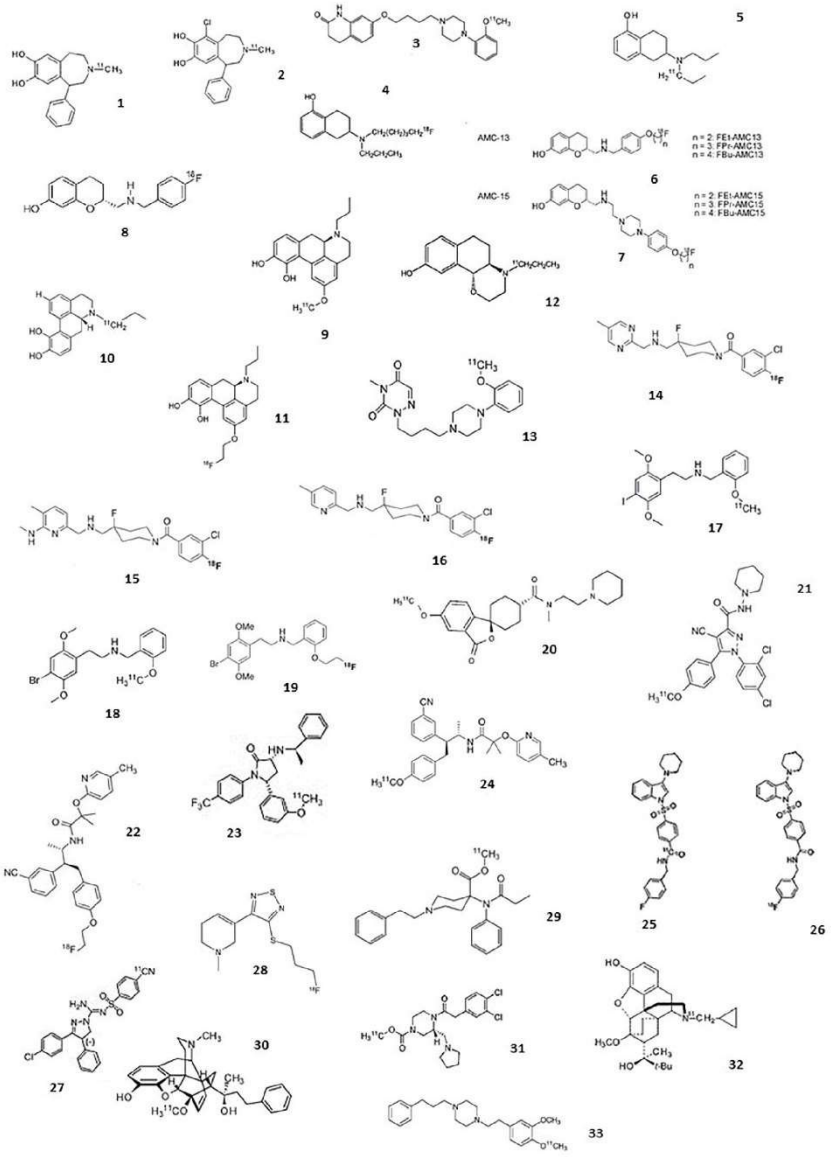


FIGURE 2 | Chemical structures of current agonist radiotracers of GPCRs. Dopamine receptors: (1) [^{11}C]SKF 82957, (2) [^{11}C]-SKF75670, (3) [^{11}C]SV-III-130, (4) [^{11}C]5-OH-DPAT, (5) [^{18}F]5-OH-FPPAT, (6) [^{18}F]FBu-AMC13 and derivatives, (7) [^{18}F]FEt-AMC15 and derivatives, (8) [^{18}F]AMC20, (9) [^{11}C]NPA, (10) [^{11}C]MNPA, (11) [^{18}F]MCL-524, (12) [^{11}C]PHNO; serotonin receptors: (13) [^{11}C]CUMI-101, (14) [^{18}F]F15599, (15) [^{18}F]F13714, (16) [^{18}F]F13640, (17) [^{11}C]Cimbi-5, (18) [^{11}C]Cimbi-36, (19) [^{18}F]FECimbi-36; histamine receptors: (20) [^{11}C]MK-8278; cannabinoid receptors: (21) [^{11}C]OMAR or [^{11}C]JHU75528; (22) [^{18}F]MK-9470, (23) [^{11}C]MePPEP, (24) [^{11}C]CB-119, (25) [^{11}C]PipISB, (26) [^{18}F]PipISB, (27) [^{11}C]SD5024; acetylcholine receptors: (28) [^{18}F]FP-TZTP; Opioid receptors: (29) [^{11}C]carfentanil, (30) [^{11}C]PEO, (31) [^{11}C]GR103545, (32) [^{11}C]buprenorphine; Sigma 1 receptors: (33) [^{11}C]SA4503.

TABLE 1 | Current agonist radiotracers of GPCRs with at least preclinical validation.

Receptor	*Subtype*	*No.∘*	*Radiotracer*	*Properties*	*PV*	*PA*	*CV*	*CA*
Dopamine	D_1	1	[^{11}C]SKF 82957	Agonist	+	+	−	−
		2	[^{11}C]-SKF75670	Agonist				
	D_2/D_3	3	[^{11}C]SV-III-130	Partial agonist	+	+	−	−
	D_2/D_3	4	[^{11}C]5-OH-DPAT	Agonist	+	−	−	−
	D_2/D_3	5	[^{18}F]5-OH-FPPAT	Agonist	+	−	−	−
	D_2/D_3	6	[^{18}F]FBu-AMC13and derivatives	Agonists				
		7	[^{18}F]FEt-AMC15 and derivatives	Agonists	+	−	−	−
		8	[^{18}F]AMC 20	Agonist				
	D_2/D_3	9	[^{11}C]NPA	Agonist	+	+	+	+
	D_2/D_3	10	[^{11}C]MNPA	Agonist	+	+	+	+
	D_2/D_3	11	[^{18}F]MCL-524	Agonist	+		−	−
	D_2/D_3	12	[^{11}C]PHNO	Agonist	+	+	+	+
Serotonin	5-HT_{1A}	13	[^{11}C]CUMI-101	Partial agonist	+/−	−	−	−
	5-HT_{1A}	14	[^{18}F]F15599	Biased agonist	+	+	−	−
	5-HT_{1A}	15	[^{18}F]F13714	Biased agonist	+	+	−	−
	5-HT_{1A}	16	[^{18}F]F13640	Agonist	+	+	+/−	−
	5-HT_{2A}	17	[^{11}C]Cimbi-5	Agonist	+/−	−	−	−
	5-HT_{2A}	18	[^{11}C]Cimbi-36	Agonist	+	+	+	+
	5-HT_{2A}	19	[^{18}F]FECimbi-36	Agonist	+/−	−	−	−
Histamine	H_3	20	[^{11}C]MK-8278	Inverse agonist	+	+	+	+
Cannabinoid	CB_1	21	[^{11}C]OMAR or [^{11}C]JHU75528	Inverse agonist	+	+	+	+
	CB_1	22	[^{18}F]MK-9470	Inverse agonist	+	+	+	+
	CB_1	23	[^{11}C]MePPEP	Inverse agonist	+	+	+	
	CB_1	24	[^{11}C]CB-119	Inverse agonist	+	−	−	−
	CB_1	25	[^{11}C]PipISB	Inverse agonist	+/−	−	−	−
		26	[^{18}F]PipISB	Inverse agonist				
	CB_1	27	[^{11}C]SD5024	Inverse agonist	+	−	−	−
Acetylcholine	M_2	28	[^{18}F]FP-TZTP	Agonist	+	+	+	+
Opioid	μ_1/μ_2	29	[^{11}C]carfentanil	Agonist	+	+	+	+
	κ & μ	30	[^{11}C]PEO	Agonist	+/−	−	−	−
	κ	31	[^{11}C]GR103545	Agonist	+	−	+	−
	all	32	[^{11}C]Buprenorphine	Partial agonist	+/−	−	−	−
Sigma	σ_1	3	[^{11}C]SA4503	Agonist	+	+	+	+

PV, preclinical validation; PAs, preclinical applications; CV, clinical validation; CA, clinical applications.Translation to human (Green)/Only preclinical studies (Blue).

receptor binding/agonism/stimulation. [^{11}C]apomorphine itself was synthesized and evaluated in rat brain as a radioligand of D_1-like and D_2-like receptors (Zijlstra et al., 1993; Finnema et al., 2010). Brain uptake and specific binding ratios were too low for satisfactory application in PET imaging. Hwang et al. (2000) proposed [^{11}C] radiolabeling of NPA, first synthesized in Neumeyer et al. (1973). NPA is a D_2 agonist with higher affinity for D_2 receptors at high affinity than for D_2 receptors at low affinity (Sibley et al., 1982). Previous studies demonstrated that its tritiated analog crossed the BBB, with high uptake in striatum (van der Werf et al., 1983). Hwang and colleagues described the radiosynthesis of [^{11}C]NPA, and biodistribution studies in rodents confirmed high uptake in striatum and a high striatum/cerebellum ratio (3.4 at 30 min post-injection). Haloperidol pretreatment decreased the striatum/cerebellum ratio to 1.3 at 30 min in rat brain. PET imaging studies on a single baboon also revealed a high striatum/cerebellum ratio of 2.8 at 45 min post-injection. A blockade study with haloperidol strongly decreased the striatum/cerebellum ratio, confirming specific binding to D_2/D_3 receptors *in vivo*. Cumming et al. (2002) demonstrated that [^{3}H]NPA was more sensitive to endogenous dopamine in striatum than the antagonist [^{11}C]raclopride in a study on living mice: both dopamine depletion by reserpine and dopamine increase by amphetamine had greater effects on the binding potential of tritiated NPA. A study in anesthetized Göttingen miniature pigs, using compartmental analyses, showed fast tracer metabolism, compensated by high brain uptake during the first minutes; the striatal binding potential was comparable with [^{11}C]raclopride, and both MPTP pretreatment and deep brain stimulation of the subthalamus failed to produce obvious effects on [^{11}C]NPA binding *in vivo* (Cumming et al., 2003). Another quantitative study in baboon validated the use of model-based approaches to quantify [^{11}C]NPA binding *in vivo* (Hwang et al., 2004).

Other PET studies in baboons confirmed its higher sensitivity to dopamine release in striatum compared to [^{11}C]raclopride (Narendran et al., 2004; Hwang et al., 2005). The proportion of D_2 receptors at high affinity was estimated to be 79% in the striatum using a bolus plus constant infusion (Narendran, 2005). A study in 1 male baboon did not show significant difference between time of recovery after amphetamine-induced dopamine release as measured by [^{11}C]raclopride and [^{11}C]NPA (Narendran et al., 2006). Subsequent studies focused on translation to humans. An initial study concluded that administration of a common dose of radiotracer (370 Mbq) yielded an acceptable dosimetric range in all organs (Laymon et al., 2009). Reproducibility studies and kinetic modeling in a second human study confirmed that [^{11}C]NPA was a reliable tool to image D_2/D_3 receptors in high-affinity state in striatum (Narendran et al., 2009). Narendran and colleagues performed a comparative evaluation of [^{11}C]NPA and [^{11}C]raclopride to measure amphetamine-induced dopamine release in the human striatum after oral amphetamine pretreatment: decreases in BP_{ND} level were slightly greater for the agonist radiotracer, whereas no significant difference was found for BP_P (Narendran et al., 2010). McCormick et al. (2010), in *ex vivo* studies, demonstrated that isoflurane increased the binding and amphetamine sensitivity of [^{11}C]NPA and other agonists in comparison with [^{11}C]raclopride, which may have been a confounding factor in several preclinical studies that reported higher sensitivity of agonist radiotracers to endogenous dopamine.

An initial clinical study in cocaine abusers versus controls did not find any differences in D_2/D_3 binding in striatum, contrary to several studies that previously reported lower binding of [^{11}C]raclopride in cocaine abusers. The authors concluded that D_2/D_3 receptors in high-affinity state may be unaltered in cocaine dependence (Narendran et al., 2011). Other preclinical studies were performed using [^{11}C]NPA: one *ex vivo* study demonstrated that it was more effective than [^{11}C]raclopride in detecting an increase in receptor availability following unilateral injections of 6-OH-DA in rat, a classical model of Parkinson's disease (Palner et al., 2011); another study in rat suggested differential distribution of tritiated NPA and raclopride in the striatum, with comparable B_{max} in the dorsal striatum and lower B_{max} for [^{3}H]NPA in the ventral striatum (Minuzzi and Cumming, 2010).

[^{11}C]MNPA

MNPA, a methoxy-NPA derivative, was initially described in Gao et al. (1990), and was characterized as a D2R agonist (K_i = 0.17 nM). A preliminary PET study in cynomolgus monkey in Halldin et al. (1992) demonstrated high binding of [^{11}C]MNPA in the striatum. Finnema et al. (2005) described an optimized radiosynthesis and further *in vivo* PET experiments in cynomolgus monkey. The study confirmed previous findings about D_2 specificity: pretreatment with unlabeled raclopride considerably decreased the signal in regions known to contain D_2 receptors. Two advantages were mentioned in comparison with [^{11}C]NPA: a fivefold higher affinity, which might enable quantitative analysis in extrastriatal regions such as thalamus, and easier radiosynthesis of [^{11}C]MNPA, which only needs [^{11}C]methylation. Metabolite analysis did not show any lipophilic metabolites which could interfere with the parent-compound signal in the brain. The sensitivity of the radiotracer to synaptic dopamine levels was then compared versus [^{11}C]raclopride in cynomolgus monkeys; [^{11}C]MNPA showed higher sensitivity. Using the same methodology of high-affinity state quantification proposed by Narendran with [^{11}C]NPA, the authors suggested that about 60% of D_2 receptors were in the high-affinity state (Seneca et al., 2006). In preparation for future human studies, a kinetic brain analysis and whole-body imaging study was performed in monkeys (Seneca et al., 2008a). Brain distribution volumes were identified using a 2-tissue compartment model and in accordance with the known distribution of D_2/D_3 receptors, and the estimated dosimetry in human, extrapolated from the preclinical results, was moderate to low. However, the authors reported that BP_{ND} values of [^{11}C]MNPA were lower than [^{11}C]raclopride or other agonist radiotracers such as [^{11}C]PHNO and [^{11}C]NPA, probably due to higher uptake in the cerebellum. Seneca et al. (2008b), the same team conducted a PET study in rat using a bolus/infusion paradigm following dopamine depletion pretreatment with reserpine plus alpha-methyl-para-tyrosine. Dopamine occupancy at baseline was estimated at 53% in rat brain, in agreement with previous results with other agonist radiotracers. In the same study, binding in striatum was displaceable with raclopride but not by BP897, a selective D_3 ligand, suggesting that [^{11}C]MNPA binds specifically to D_2 and not D_3 receptors. Skinbjerg et al. (2009) conducted a precise pharmacological characterization of MNPA with *in vitro* studies on recombinant cells and membrane preparations. They concluded that MNPA was a full agonist of D_2 and also D_3 receptors (in contrast to previous *in vivo* findings). Also, two high- and low-affinity binding states were observed only for membrane preparations and not for cells. Other preclinical studies were conducted the same year: Finnema et al. (2009) determined the occupancy of the agonist apomorphine at increasing doses in cynomolgus monkey using [^{11}C]raclopride and [^{11}C]MNPA. Contrary to the hypothesis that agonist radioligands are more sensitive than antagonists to competition with pharmacological doses of agonists, there was no difference between Ki and ID50 determined with both radiotracers, suggesting that all $D_{2/3}$ receptors are in high-affinity state or that there is only a single receptor state. Tokunaga et al. (2009) reported an example of a drug discovery approach using *in vivo* imaging with [^{11}C]MNPA to detect dopamine neurotransmission system modulation by MPEP, an antagonist of group $mGlu_1$ receptors. Steiger et al. (2009), an optimization of radiosynthesis was also described, with a time of about 40 min after radionuclide production.

The first clinical trial, on 10 subjects, in Otsuka et al. (2009), used a classical protocol with arterial blood sampling and metabolite analysis (and PET procedure). Results showed a distribution pattern in concordance with the D_2 receptor distribution. The SRTM and transient equilibrium methods were validated to estimate binding potentials. Another clinical study investigated binding of the antipsychotic risperidone on high- or low-affinity D_2 receptors with [^{11}C]raclopride and [^{11}C]MNPA and found that risperidone bound indifferently to both states of

D_2 receptors, with comparable occupancies and ED50 values for both tracers (Kodaka et al., 2010). In 2013, a study investigated the reproducibility of the binding potential ratio of [^{11}C]MNPA to [^{11}C]raclopride, reflecting the proportion of receptors in high-affinity state compared to overall receptor density; reproducibility was satisfactory in the caudate and putamen (Kodaka et al., 2012). More recently, the same team studied the different D_2 receptor affinity states in 11 antipsychotic-free schizophrenic patients, using [^{11}C]raclopride and [^{11}C]MNPA; the binding potential ratio (agonist/antagonist) was significantly higher in the putamen in patients than control subjects, despite unchanged levels of total D_2 receptors (Kubota et al., 2017).

Other preclinical studies using [^{11}C]MNPA were conducted over the years. Skinbjerg et al. (2010) showed that *in vivo* striatal binding of the tracer was unchanged in dopamine beta-hydroxylase-deficient mice, concluding that their increased sensitivity to psychostimulants was not due to a higher proportion of receptors in the high-affinity state. The same year, the D_2 receptor occupancies of quinpirole, aripiprazole, and haloperidol were estimated in conscious rats, using tritiated MNPA, PHNO, and raclopride (Peng et al., 2010). All compounds showed similar occupancy values with the different radioligands, presumably due to a high proportion of receptors in the high-affinity state *in vivo*. Another study, focusing on stress in conscious monkeys, showed that stress level correlated negatively with [^{11}C]raclopride binding, and positively with [^{11}C]MNPA binding (Tsukada et al., 2011).

[^{11}C]PHNO

The first radiolabeling and preclinical evaluation of the napthoxazine derivative D2-agonist (+)-4-Propyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-naphtho[1,2-b]-[1,4]-oxazin-9-ol, or (+)-PHNO, was reported in Wilson et al. (2005). [^{11}C]-(+)-PHNO binding in rat brain was highly selective and specific to D2 receptors. The tracer also showed sensitivity to increases and decreases in endogenous dopamine levels. The full D_2 agonistic properties of (+)-PHNO were previously documented (Jones et al., 1984). The first-in-man study was performed 1 year later (Willeit et al., 2006). [^{11}C]-(+)-PHNO displayed good brain uptake and favorable kinetics; test–retest data suggested BP estimates to be reliable, and pre-treatment with haloperidol reduced specific binding without detectable changes in cerebellum, validating its utility as a D_2-receptor agonist radioligand for PET. Binding in the globus pallidus was greater than with the D_2 antagonist [^{11}C]raclopride, suggesting that [^{11}C]-(+)-PHNO also binds significantly to D_3 receptors in humans. Tracer distribution, displaceability by endogenous dopamine, specificity and modeling properties were further explored in cat and compared versus [^{11}C]raclopride (Ginovart et al., 2006a). Although Scatchard analysis showed comparable Bmax values with both [^{11}C]-(+)-PHNO and [^{11}C]-raclopride, the agonist was more sensitive than the antagonist to dopamine release (BP inhibition up to 83 versus 56%, respectively). The signal-to-noise ratio in the striatum was also 2.5-fold higher than that of [^{11}C]NPA. Unusually high binding in the globus pallidus was reported in baboons and explained by higher affinity of [^{11}C]-(+)-PHNO for D_3 receptors than other D_2/D_3 radioligands, possibly contributing to its greater vulnerability to endogenous dopamine (dopamine affinity being higher for D_3 than D_2 receptors) compared to other radioligands (Narendran et al., 2006).

Kinetic modeling of the tracer was then described in humans (Ginovart et al., 2006b), to enable [^{11}C]-(+)-PHNO binding to be quantified in clinical studies. Willeit et al. (2008), the D_2–D_3 agonist radioligand was reported to be sensitive to competition with endogenous dopamine in humans. Several studies were then performed with [^{11}C]-(+)-PHNO, to study the high-affinity state of D_2 receptors, D_3 receptors and endogenous dopamine release in schizophrenia, addiction or according to social status (Graff-Guerrero et al., 2008; Mizrahi et al., 2011, 2012; Le Foll et al., 2013; Matuskey et al., 2015; Caravaggio et al., 2016). This radiotracer was often compared to [^{11}C]raclopride, but it is unclear if the differences between the two radiotracers are due to the agonistic properties of [^{11}C]-(+)-PHNO or to its higher affinity for D_3 receptors. For instance, [^{11}C]-(+)-PHNO shows preferential uptake in the ventral striatum and globus pallidus, due to the high density of D_3 receptors in these areas, whereas [^{11}C]raclopride shows preferential uptake in the dorsal striatum; [^{11}C]-(+)-PHNO wash-out is also slower in the globus pallidus compared to the other regions (Graff-Guerrero et al., 2008). Similarly, a PET study in Parkinson's disease showed a significant decrease in [^{11}C]-(+)-PHNO levels in the globus pallidus, in contrast to [^{11}C]raclopride, and an agonist/antagonist ratio that decreased proportionally to motor deficit and lowered mood, interpreted as the consequence of D_3 receptor density modifications (Boileau et al., 2009). Searle et al. (2010) suggested that [^{11}C]-(+)-PHNO uptake is due to high-affinity D_2 receptors in the dorsal striatum, to high-affinity D_2 receptors and D_3 receptors in the ventral striatum, globus pallidus and thalamus, and only to D_3 receptors in the substantia nigra). Numerous preclinical studies were also performed using [^{11}C]-(+)-PHNO. Seeman et al. (2007) reported a 2-to-3-fold increase in high-affinity D_2 receptors in rat following repeated injection of amphetamine, explaining why the animals were more sensitive to dopaminergic agonists. One year later, the sensitivity was compared between [^{11}C]-(+)-PHNO and [^{3}H]raclopride after various pharmacological challenges in conscious rats (McCormick et al., 2008). Similar degrees of inhibition were shown for both radiotracers following the pre-injection of amphetamine, cold NPA (a full agonist), aripiprazole (a partial agonist), haloperidol and clozapine (D_2 antagonists). However, these results were contradicted by another study that showed greater *ex vivo* inhibition of [^{3}H]PHNO binding by NPA than by [^{3}H]raclopride, and greater displacement of the agonist radiotracer in amphetamine-sensitized rats (Kumar et al., 2006; Seeman, 2009). Contrasting results were published the same year by McCormick et al. (2009), underlining significant discrepancies in the field which require further study.

D_4 Receptors

Although no convincing radiotracer specific to D_4 receptors is presently available for PET neuroimaging in the human brain, the discovery of an inverse agonist was reported in Prante et al. (2008). The compound was derived from FAUC 113 and FAUC 213 and was more selective for D_4 receptors than for D_2

and D_3 receptors. The [^{18}F]-labeled molecule showed specific binding in rat brain *in vitro*, but no further investigations have yet been reported.

Serotonergic Receptors

Serotonin neurotransmission is characterized by a large number of subfamilies of receptors (14 are currently described). After the dopaminergic system, it is the second neurotransmission system to have benefited from the development of many PET radiotracers. While a significant number of them can be used in humans as radiopharmaceuticals, most are antagonists and currently very few agonists are available. However, the therapeutic potential of these many sub-families of receptors in psychiatry and neurology justifies further research in this area.

5-HT$_{1A}$ Receptors

From [^{18}F]F15599 to [^{18}F]F13640

Much effort has been made to develop a radiotracer agonist of 5-HT$_{1A}$ receptors, with initially limited success. These attempts included exploration of derivatives of various structures (analogs of 8-OH-DPAT and apomorphine, arylpiperazine, or thiochromine based ligands) which showed promising properties *in vitro* but were generally not suitable for *in vivo* imaging because of lack of evidence of specific binding (Thorell, 1995; Mathis et al., 1997; Suehiro et al., 1998; Hwang et al., 2001; Fujio et al., 2002; Zimmer et al., 2003; Vandecapelle et al., 2004). Lemoine et al. (2010), the well-characterized agonist F15599, initially seen as a drug candidate, was radiolabeled with [^{18}F] and explored by PET imaging in rats and cats. It showed high affinity (K_i = 2.2 nM) and excellent specificity for 5-HT$_{1A}$ receptors, acting as a full agonist both *in vitro* and in pharmacological tests in rats, with preferential activity at post-synaptic receptors (Newman-Tancredi, 2011). Despite encouraging *in vitro* results, the signal-to-noise ratio was insufficient for PET imaging. Its structural analog, [^{18}F]F13714, displaying higher affinity for 5-HT$_{1A}$ receptors (K_i = 0.1 nM), was also evaluated (Lemoine et al., 2012). Despite a better SNR and evidence of binding to 5-HT$_{1A}$ receptors *in vivo*, [^{18}F]F13714 binding was irreversible in rat, cat and rhesus monkey, which suggests it would be difficult to quantify binding parameters in humans. Interestingly, [^{18}F]F13714 was also compared with the antagonist [^{18}F]MPPF in conscious and anesthetized marmosets; it displayed a markedly different distribution pattern from [^{18}F]MPPF, with highest uptake in raphe and cortical areas, as opposed to hippocampus and amygdala for the antagonist radiotracer. It also showed region-specific uptake changes in isoflurane-anesthetized animals, contrary to [^{18}F]MPPF for which global increase throughout the brain was observed (Yokoyama et al., 2016). Top design a radiotracer that would be easier to quantify, the structural analog [^{18}F]F13640 was recently evaluated (Vidal et al., 2018). F13640 also exhibits high selectivity for 5-HT$_{1A}$, but intermediate affinity (K_i = 1 nM) compared to the previous two attempts. [^{18}F]F13640 showed specific binding to 5-HT$_{1A}$ receptors and agonistic properties *in vitro* and *in vivo* in rats, cats and rhesus monkeys, despite a distribution pattern contrasting with antagonist radiotracers (and similar to that of [^{18}F]F13714). Moreover, *ex vivo* autoradiography experiments using pharmacological challenge with d-fenfluramine in rats suggested that [^{18}F]F13640 is far more sensitive to competition with endogenous serotonin than the antagonist [^{18}F]MPPF. Despite a slow washout, tracer binding is reversible, with increased washout after administration of fenfluramine, a serotonin releaser, during scanning in rats and cats (unpublished data). An autoradiographic study performed on postmortem hippocampus slices from AD patients at different Braak stages also demonstrated a decrease in [^{18}F]F13640 binding in the CA1 area, occurring earlier than the decrease in [^{18}F]MPPF binding in AD subjects. Further studies are ongoing to characterize the properties of [^{18}F]F13640, and a first-in-man study is currently underway (clinicaltrials.gov number: NCT03347331). The first images in human showed a binding pattern different from that seen with the conventional antagonist 5-HT$_{1A}$ radiopharmaceutical [^{18}F]-MPPF (Colom et al., 2019).

5-HT$_{2A}$ Receptors

From [^{11}C]Cimbi5 to [^{11}C]Cimbi36

Ettrup et al. (2010) reported [^{11}C]-labeling and evaluation of the *N*-benzyl phenylethylamine derivative Cimbi-5, previously described as a selective and very potent agonist for 5-HT$_{2A}$ receptors (Braden et al., 2006). [^{11}C]Cimbi-5 distribution was consistent with the known 5-HT$_{2A}$ distribution, and it was blocked by the antagonist ketanserin in pig brain (Ettrup et al., 2010). In an attempt to optimize the target-to-background binding ratio, the same team evaluated 9 other phenylethylamine analogs of [^{11}C]Cimbi-5 in pig (Ettrup et al., 2011). The analog [^{11}C]Cimbi-36 was identified as the most promising candidate for PET imaging of 5-HT$_{2A}$ receptors as it showed the highest target-to-background binding ratio and was displaceable by ketanserin. *In vitro* studies confirmed that Cimbi-36 was a potent and selective 5-HT$_{2A}$ agonist (K_i = 1 nM, ED_{50} = 0.5 nM). Its properties were then characterized in non-human primate and compared with the antagonist [^{11}C]MDL-100907 (Finnema et al., 2014). [^{11}C]Cimbi-36 distribution was again consistent with the known 5-HT$_{2A}$ distribution and blocked by ketanserin in all brain regions except the cerebellum, which was found to be a suitable reference region. Binding potential was approximately half that of [^{11}C]MDL-100907 across cortical regions but higher in other brain regions such as the choroid plexus, which was found to be related to 5-HT$_{2C}$ receptor binding as it was blocked by the 5-HT$_{2C}$ ligand SB 242084. The authors concluded that [^{11}C]Cimbi-36 was an agonist radioligand suitable for examination of 5-HT$_{2A}$ receptors in cortical regions and of 5-HT$_{2C}$ receptors in the choroid plexus of the primate brain. The first-in-man study was performed in 29 healthy volunteers, with arterial input measurement and pretreatment with ketanserin in 5 subjects (Ettrup et al., 2014). The authors concluded that [^{11}C]Cimbi-36 was a suitable agonist radioligand for PET imaging of high-affinity 5-HT$_{2A}$ receptors in the cortex, and that cerebellum was an appropriate reference tissue for quantification without blood sampling. Recently, test–retest reproducibility was investigated and the distribution was compared to the antagonist [^{18}F]altanserin in humans (Ettrup et al., 2016).

The results showed excellent test–retest reproducibility and a high correlation between the two radiotracers, Cimbi-36 and altanserin, except in regions with high 5-HT_{2C} receptor density (choroid plexus and hippocampus), where [^{11}C]Cimbi-36 binding is probably to both 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. Sensitivity in detecting changes in endogenous 5-HT levels was also explored in pig brain using various pharmacological challenges, by simultaneous measurement of extracellular 5-HT concentration with microdialysis and PET imaging (Jorgensen et al., 2017). There was a significant correlation between 5-HT levels and 5-HT_{2A} occupancy, indicating that [^{11}C]Cimbi-36 is sensitive to competition with serotonin, although only at sufficiently high release. Another study in rhesus monkey demonstrated significant decrease in [^{11}C]Cimbi-36 binding in most brain regions following administration of fenfluramine at 5 mg/kg (Yang et al., 2017). The tracer was found to be more sensitive to 5-HT release than the antagonist [^{11}C]MDL 100907, and with sensitivity comparable to [^{11}C]AZ10419369, a 5-HT_{1B} partial agonist currently considered to be one of the most sensitive radioligands.

Finally, a study in humans recently compared two positions of [^{11}C]-labeling for the tracer and concluded that the position initially chosen in the previous studies produced a higher signal-to-noise ratio (Johansen et al., 2018).

Cannabinoid Receptors

The endocannabinoid system is more recent in discovery compared to previous monoaminergic systems. This neurotransmission system seems to play key modulatory roles in the brain and much effort has been made to try to understand precisely its pathophysiological role in various behavioral and neurological diseases. While there are currently two known subtypes of cannabinoid receptors, termed CB_1 and CB_2, only the first have benefited from the development of agonist radiotracers.

CB_1 Receptors

[^{11}C]JHU75528 or [^{11}C]OMAR

Fan et al. (2006) reported the synthesis of [^{11}C]JHU75528, to image CB_1 receptors. The tracer showed higher *in vitro* affinity and lower lipophilicity than the two prototypical CB_1 agonists, rimonaban and AM281). Autoradiography studies in mice and PET studies in baboon showed high cerebral uptake, good SNR and specific binding displaced by the cold ligand or rimonaban pretreatment. Metabolite analysis demonstrated that a few fractions cross the BBB (Horti et al., 2006). The first clinical assays on humans confirmed a good CB_1 receptor quantification (Horti, 2007; Wong et al., 2008). In terms of quantification, plasma reference graph analysis (Logan et al., 1990) was found to be more reliable than the two-compartmental model for estimating Vt. It was not possible to use pons or white matter as reference regions, due to small size and lack of favorable kinetics, respectively (Wong et al., 2010). Comparison between healthy volunteers and schizophrenic patients found elevated values in patients, especially in the pons region. This preliminary study showed the potential of Vt values to prove CB_1 involvement in schizophrenia and to predict the type and severity of clinical symptoms. Gao et al. (2012) proposed a new synthesis route for [^{11}C]OMAR and analogs, and Normandin explored more precisely the quantification of the tracer in humans (Normandin et al., 2015). They found that multilinear analysis was the most robust method. Test–retest reproducibility was satisfactory. There were significant sex differences in tracer properties, and especially in metabolism and brain uptake. These findings suggest that [^{11}C]OMAR is a reliable radiotracer and that, in this case, gender differences must be considered in PET analysis.

[^{18}F]MK-9470

Continuing previous efforts to develop a CB_1 receptor radiotracer, Burns et al. (2007) developed [^{18}F]MK-9470, a specific inverse agonist, in a context of drug development. The *in vitro* affinity of MK-9470 was 0.7 nM with a 60-fold selectivity for CB_1 receptors in comparison with CB_2 receptors. Autoradiography studies on rhesus brain slices showed a signal consistent with CB_1 receptor distribution. PET studies in monkeys showed rapid uptake with displaceable binding by the specific inverse agonist MK-0364. *In vivo* PET study in humans showed slow kinetics with high uptake in striatum, frontal cortex and posterior cingulate. Metabolite analysis and test–retest reproducibility were satisfactory enough to envisage [^{18}F]MK-9470 as a suitable radiotracer to explore CB_1 receptor density. These findings were applied to determine the occupancy of the inverse agonist MK-0364. One year later, a biodistribution and radiation dosimetry study demonstrated acceptable dose exposure and the feasibility of multiple scans (Van Laere et al., 2008b). The tracer was also used to assess gender differences in CB_1 receptor distribution and changes in receptor expression with healthy aging (Van Laere et al., 2008a). Several clinical studies were then performed, including a drug occupancy study of the CB_1 receptor inverse agonist taranabant (Addy et al., 2008), and studies exploring the relationship between CB_1 receptors and personality traits (Van Laere et al., 2009), temporal lobe epilepsy (Goffin et al., 2011), Parkinson's disease (Van Laere et al., 2012), eating disorder (Gérard et al., 2011; Ceccarini et al., 2016), migraine (Van der Schueren et al., 2012), schizophrenia (Ceccarini et al., 2013), AD (Ahmad et al., 2014), chronic cannabis use (Ceccarini et al., 2015), alcohol abuse (Ceccarini et al., 2014), and Huntington's disease (Ceccarini et al., 2019). The tracer was also used in numerous preclinical studies (Goffin et al., 2008; Casteels et al., 2010a,b,c,d, 2011, 2014; Gérard et al., 2010; Ooms et al., 2014; Cleeren et al., 2018). Several studies were also performed to optimize quantification in humans (Sanabria-Bohórquez et al., 2010) and rats (Casteels et al., 2012; Miederer et al., 2018) and radiosynthesis (Thomae et al., 2014).

Muscarinic Receptors

Muscarinic acetylcholine neurotransmission have been described for several decades and its interest has resurfaced more recently because of their implications in neurodegenerative diseases, justifying research work in PET neuroimaging. Five subtypes

of muscarinic receptors have been determined, named M_1–M_5. Among them, only the M_2 family has benefited from the development of agonist PET radiotracers used in humans.

M_2 Receptors

[^{18}F]FP-TZTP

In this context, Sauerberg et al. (1992) developed a series of muscarinic agonists containing a thiadiazolyl moiety. Based on these data, three fluorinated derivatives of TZTP were evaluated *in vitro* for their affinity toward the various muscarinic receptors (Kiesewetter et al., 1995). The derivative FP-TZTP displayed higher affinity for M2 than M1 receptors (K_i = 2.2 vs. 7.4 nM) and was radiolabeled with [^{18}F] and further evaluated in rat. [^{18}F]FP-TZTP displayed specific binding, being dose-dependently blocked by the analog P-TZTP, also a M2-preferring agonist, but only partially blocked by antagonists of M1 or M2 receptors., [^{18}F]FP-TZTP was then evaluated in preclinical *in vitro* and *in vivo* studies in rats and monkeys: [^{18}F]FP-TZTP showed specific binding to M2 receptors, significantly inhibited by cold compound and L-687,306, a muscarinic agonist. Uptake was significant in cortical and subcortical regions, with low uptake in cerebellum. Metabolism study in rats showed no significant presence of radiometabolites in the brain (Kiesewetter et al., 1999). The 1-compartmental model was the most reliable for determining distribution volume in rhesus monkey (Carson et al., 1998). Finally, [^{18}F]FP-TZTP was sensitive to variations in ACh levels induced by physostigmine, an AChEI. Kiesewetter et al. (2003) reported 1-step automated radiosynthesis of [^{18}F]FP-TZTP, and Ma et al. (2003) described a method using liquid–liquid PE and solid phase extraction to rapidly measure concentrations of tracer and metabolites thanks to the previous identification of the metabolite structures by LC-MS-MS (Ma et al., 2002).

The first-in-man study was performed in Podruchny et al. (2003) on healthy young and older volunteers. The binding pattern of [^{18}F]FP-TZTP was consistent with the known M2 receptor distribution. Older subjects had significantly greater distribution volumes, which was explained by lower synaptic acetylcholine concentrations. Jagoda et al. (2003) used different models of KO mice to confirm the M2 selectivity of [^{18}F]FP-TZTP, demonstrating a significant decrease in binding (from 51 to 61%) only in M2R KO mice, almost none in M1R KO mice (about 20% in amygdala and hippocampus), and none in M3R and M4R KO mice. Considering the fact that P-TZTP and the cold agonist FP-TZTP used in competition studies could produce changes in cerebral blood flow, decreasing the PET signal by reduced tracer delivery rather than by competition for receptors, Shimoji et al. (2003) showed that inhibition of [^{18}F]FP-TZTP by these compounds was not due to agonist-induced reduction in CBF: the degree of tracer uptake inhibition was unchanged when a peripheral muscarinic antagonist was combined with muscarinic agonists to prevent the CBF changes induced by agonists alone. In a new clinical study, [^{18}F]FP-TZTP was used to compare two populations of healthy subjects with and without apolipoprotein E-epsilon 4 allele, which is associated with increased susceptibility to AD and age-related memory problems (Cohen et al., 2003). APOE-epsilon4+ subjects had greater distribution volumes in gray matter than APOE-epsilon4- subjects, which was again interpreted in terms of synaptic acetylcholine concentration differences. [^{18}F]FP-TZTP was then used to understand the cholinergic contribution to the emotional and sensory effects of procaine. Procaine dose-dependently decreased [^{18}F]FP-TZTP specific binding (Benson et al., 2004). Following the 2003 clinical study, a new study was performed to evaluate the influence of age and APOE-epsilon4 genotype on the increase in acetylcholine concentration induced by physostigmine infusion and the distribution volumes of [^{18}F]FP-TZTP (Cohen et al., 2006). It was also demonstrated that physostigmine induced a decrease in [^{18}F]FP-TZTP uptake, and that both age and APOE-e4 genotype influenced the modulation of PET signal by physostigmine infusion. Furthermore, [^{18}F]FP-TZTP was used to demonstrate the involvement of M2 receptors in mood disorders: there was decreased binding in patients suffering from bipolar disorder, which could be due to a reduction in M2 receptor density or affinity, or to an increase in endogenous acetylcholine levels (Cannon et al., 2006). van Oosten et al. (2009) reported an optimized radiosynthesis using a new precursor. Cannon et al. (2011), another clinical study was performed combining [^{18}F]FP-TZTP-PET and genetic analyses: it was shown that single nucleotide polymorphisms for the M2R gene were associated with changes in [^{18}F]FP-TZTP binding in bipolar disorder patients. Finally, Ravasi et al. (2012) found that constant infusion of [^{18}F]FP-TZTP was better than bolus injection for performing microPET in rodents: blood clearance and metabolism were too rapid to measure a reproducible input function after bolus injection.

Histaminergic Receptors

There are four known histamine receptors, H_1, H_2, H_3, and H_4. The first imaging works focused on the H_1 receptor but without the development of PET agonists. More recently, H_3 receptor, a target with emerging pathophysiological implications, has led to the development of agonist radiotracers.

H_3 Receptors

The H_3 receptor has a presynaptic location and is involved in the regulation of histamine neurotransmission and modulation of release of other neurotransmitters (Van Laere et al., 2013). Thus, it has been demonstrated that, instead of only interfering with the negative feedback loop of histamine like an antagonist, H_3 inverse agonists potentialize histaminergic neurotransmission by decreasing constitutive H_3 signaling. These pharmacological properties suggest new treatments for various psychiatric or neurodegenerative diseases. According to the two-state model of agonist action, inverse agonists may have higher affinity for the inactive state of the receptor (Leff et al., 1985; Berg and Clarke, 2018). Concomitant development of H_3 receptor inverse agonist radiotracers therefore seems important for the development of new H_3 inverse agonists as therapeutic agents, as such radiotracers may better reflect the population of receptors actually targeted by these new ligands.

Spiro-Isobenzofuranone Derivative: [^{11}C]MK-8278

In this context, in Hamill et al. (2009) reported the radiosynthesis and evaluation of two promising inverse agonists, as shown by the inhibition of basal [^{35}S]GTPgammaS binding to membrane homogenates expressing recombinant H_3 receptor derived from a family of spiro-isobenzofuranone-based compounds (Jitsuoka et al., 2008). The study described a radiosynthesis with high specific activity and revealing appropriate *in vitro* autoradiographic distribution in rhesus monkey and human brain, and specific binding in PET experiments in rhesus monkey for both compounds, with greater brain uptake for [^{11}C]MK-8278. Using a bolus plus infusion method and *in vivo* PET imaging with [^{11}C]MK-8278 in rhesus monkeys, the authors also determined the occupancy of diverse H_3 receptor inverse agonists in relation to their plasma concentration. Van Laere et al. (2014) confirmed the utility of [^{11}C]MK-8278 as a specific radioligand to evaluate *in vivo* occupancy of new H_3 inverse agonists in human brain.

They first described whole-body biodistribution and dosimetry in humans, and found that the effective dose was in the typical range of other [^{11}C]-labeled radiopharmaceuticals. The binding parameters of [^{11}C]MK-8278 were quantified using a metabolite-corrected arterial input function. 1TCM and SRTM methods, considering pons as a reference region, showed reproducible estimates of Vt and BP_{nd} values, respectively. Finally, the authors determined the human pharmacological profile of two inverse agonists, MK-024 and MK-3134, taken orally at various doses 6 h prior the PET scan; they thus obtained the receptor occupancy of both compounds as a function of oral dose or plasma concentration, demonstrating the key role of [^{11}C]MK-8278 for characterizing target engagement of H_3 inverse agonists (by calculating RO as a function of plasma concentration).

Opioid Receptors

There are four major subtypes of opioid receptors named delta (δ), kappa (κ), mu (μ), and nociceptin receptors. Agonist radiotracers of opioid receptors development was mainly derived by radiolabeling of existing drugs and displayed extensive use to understand physiopathological mechanisms in various diseases.

μ Opioid Receptors

[^{11}C]Carfentanil

Radiosynthesis of the very potent μ-opioid agonist [^{11}C]carfentanil was reported in Dannals et al. (1985), quickly followed by a first PET study in humans and baboons (Frost et al., 1985). High radioactivity levels were found in the striatum and thalamus and low levels in the cerebellum and occipital cortex, consistent with the known regional density of μ receptors. [^{11}C]carfentanil binding was also strongly reduced by pretreatment with the antagonist naloxone, confirming its high specificity and suitability as an opioid receptor agonist radiotracer. It was then used in a clinical PET study to demonstrate elevated μ receptor concentration in temporal lobe epilepsy (Frost et al., 1988). A multicompartmental analysis was performed to quantify the binding parameters of [^{11}C]carfentanil in human brain (Frost et al., 1989), and an *in vitro* binding study with the tritiated molecule further demonstrated its selectivity for the μ receptor subtype in human and rat brain (Titeler et al., 1989).

Frost et al. (1990), the binding patterns of [^{11}C]carfentanil and the antagonist [^{11}C]diprenorphine were compared in humans, showing different regional distributions that were explained by the non-selectivity of diprenorphine for the different subtypes of opioid receptors. In addition, a study focusing on temporal epilepsy demonstrated significant changes in opioid receptors with [^{11}C]carfentanil but not [^{11}C]diprenorphine (Mayberg et al., 1991). Zubieta et al. (1996), a study demonstrated the involvement of the opioid system in addiction by showing that [^{11}C]carfentanil binding was increased in cocaine-dependent subjects compared to healthy controls, and correlated positively with cocaine craving. Since then, a huge number of clinical PET studies of μ receptors have been performed with [^{11}C]carfentanil, focusing on epilepsy (Madar et al., 1997), the menstrual cycle (Smith et al., 1998), gender and age differences (Zubieta et al., 1999), addiction (Zubieta et al., 2000; Bencherif et al., 2004; Gorelick et al., 2005, 2008; Heinz et al., 2005; Greenwald et al., 2007; Scott et al., 2007a; Weerts et al., 2008, 2011, 2014; Ghitza et al., 2010; Ray et al., 2011; Falcone et al., 2012; Minkowski et al., 2012; Mitchell et al., 2012; Wand et al., 2012; Kuwabara et al., 2014; Domino et al., 2015; Mick et al., 2016; Nuechterlein et al., 2016; Hermann et al., 2017; Majuri et al., 2017), eating disorders (Bencherif et al., 2005; Karlsson et al., 2015, 2016; Tuominen et al., 2015; Joutsa et al., 2018), PTSD (Liberzon et al., 2007), major depression (Kennedy et al., 2006; Prossin et al., 2011; Hsu et al., 2015; Peciña et al., 2015a; Light et al., 2017) pain (Bencherif et al., 2002; Scott et al., 2007b, 2008; Wager et al., 2007; Harris et al., 2009; DosSantos et al., 2012; Hagelberg et al., 2012; Campbell et al., 2013; Martikainen et al., 2013; DaSilva et al., 2014a,b; Peciña et al., 2015b; Karjalainen et al., 2017) and behavior or emotions (Hsu et al., 2013; Mitchell et al., 2013; Nummenmaa et al., 2015, 2018; Karjalainen et al., 2016; Manninen et al., 2017; Tuulari et al., 2017; Saanijoki et al., 2018). [^{11}C]carfentanil was used to measure the receptor occupancy of buprenorphin in heroin-dependent subjects (Zubieta et al., 2000; Greenwald et al., 2007), and of nalmefene in healthy subjects (Ingman et al., 2005). A multimodal study also evaluated μ receptor occupancy by the opioid receptor antagonist naltrexone and the inverse agonist GSK1521498 in relation with the modulation of the fMRI response to a food stimulus (Rabiner et al., 2011). [^{11}C]carfentanil appeared to be sensitive to endogenous opioid fluctuations in studies showing decreased binding potential during somatic pain (Bencherif et al., 2002; Scott et al., 2007b), after placebo administration (Zubieta et al., 2005; Scott et al., 2008) and after pharmacological challenge associated with release of opioid peptides (Colasanti et al., 2012).

[^{18}F]-labeled derivatives of carfentanil, [^{18}F]fluoro-pentyl carfentanil and the analog sufentanil, [^{18}F]fluoro-propyl-sufentanil were developed by Henriksen et al. (2005a). Both compounds had nanomolar affinity for μ-opioid human receptors, and their distribution in rat brain slices was consistent with μ-opioid receptor expression. The derivative of sufentanil

produced almost no radioactive metabolites in mouse brain (Henriksen et al., 2005b). However, no further results have yet been reported.

κ Opioid Receptors

[^{11}C]GR89696 and [^{11}C]GR103545

[^{11}C]GR89696, a racemate that is an antagonist of κ_1 receptors and agonist of κ_2 receptors, was synthesized and evaluated in mice in Ravert et al. (1999). Uptake was in good agreement with known kappa opioid receptor distribution and was inhibited by kappa opioid-selective drugs. The R and S enantiomers of [^{11}C]GR89696 were later characterized separately, showing that only the R enantiomer [^{11}C]GR103545 exhibited selective and saturable binding to kappa receptors (Ravert et al., 2002). [^{11}C]GR103545 regional binding patterns in baboon brain were also consistent with the established distribution of kappa receptors, and binding was blocked by naloxone pretreatment (Talbot et al., 2005). Another study showed that [^{11}C]GR103545 also had high affinity for kappa receptors in humans *in vitro* (K_i = 0.02 nM) and in awake rhesus monkeys (Schoultz et al., 2010). K_d and B_{max} were estimated using a Scatchard plot in a bolus/infusion protocol, in the same species (Tomasi et al., 2013).

The first-in-man study was performed in Naganawa et al. (2014) and showed the suitability of the tracer for imaging and quantifying kappa receptors in humans, although quantification of kinetic parameters can be difficult due to lack of a reference region and to slow kinetics. Recently, a pilot study of kappa opioid receptor binding in major depression was conducted, using [^{11}C]GR103545 to compare distribution volumes between healthy volunteers and patients suffering from major depressive disorder; no significant differences were detected (Miller et al., 2018). The tracer was also used to investigate the effect of various ligands on the kappa opioid receptor in rodents (Placzek et al., 2015). First, the authors validated the use of [^{11}C]GR103545 to measure drug occupancy at kappa receptors by showing that specific binding was blocked by pre-injection of GR89696 and the antagonists naloxone and LY2795050. Then, they showed that injections of the kappa receptor agonist salvinorin A 1 min before the PET scan induced a dose-dependent decrease in [^{11}C]GR103545 binding potential. At sufficiently high dose, this decrease persisted up to 2.5h after administration, although the half-life of salvinorin A is only few minutes, suggesting an agonist-induced adaptive response by kappa receptors. The same authors demonstrated that, although the agonist [^{11}C]GR103545 and the antagonist [^{11}C]LY2459989 have similar distribution patterns in rat brain, they differed in sensitivity to competition with various kappa receptor ligands (Placzek et al., 2018): the binding potential of both tracers was reduced to a similar extent by pre-injection of the opioid receptor antagonists naloxone and naltrexone, and the selective kappa receptor antagonist LY2795050, whereas other kappa antagonists blocked [^{11}C]GR103545 binding more effectively (Bruchas et al., 2007). Finally, the kappa agonists butorphan and GR89696 showed comparable impact on the binding potentials of [^{11}C]GR103545 and [^{11}C]LY2459989, whereas the other agonists, salvinorin A and U-50488, significantly decreased [^{11}C]GR103545 uptake and had no effect on [^{11}C]LY2459989 (Placzek et al., 2018). The authors explained these findings by a likely different conformation recognized by LY2459989, as the mutation of the residue D138 dramatically decreased the affinity of LY2459989 and not GR103545 for kappa opioid receptors.

Sigma Receptors

Initially considered as part of opioid receptors, pharmacological properties of sigma receptors identified them as a specific family of receptors. Two subfamilies of sigma receptors are currently identified, σ1 and σ2 receptors. If the role of σ_1 receptors is not well-defined, potential therapeutic applications emerge in experimental neurology, justifying the research of PET agonist radiotracers.

σ_1 Receptors

[^{11}C]SA4503

Kawamura et al. (1999) reported [^{11}C]-radiolabeling and evaluation of SA6298, a selective σ_1 receptor agonist. The compound showed high brain uptake *in vivo* in rats and 1 cat, but the signal was mostly non-specific. The same team evaluated the analog [^{11}C]SA4503, which has slightly lower affinity but better specificity for σ_1 receptors, with more encouraging results (Kawamura et al., 2000): there was high specific uptake in rat brain *in vivo*, as shown by blocking studies which decreased the signal proportionally to the σ_1 affinity of the various ligands. Moreover, no radiolabeled metabolites were found in the brain. [^{11}C]SA4503 binding in mouse and cat brain was also highly specific (Kawamura et al., 2000). Further experiments in conscious monkeys confirmed it as a promising radiotracer (Ishiwata et al., 2001). Although uptake increased continuously during control scans, tracer binding was displaced by haloperidol, which has high affinity for σ_1 receptors. [^{11}C]SA4503 was then used to investigate the time-course occupancy of σ_1 receptors by haloperidol in mice (Ishiwata et al., 2003) and humans (Ishiwata et al., 2006), and its tritiated analog was used to measure age-related changes in σ_1 receptor expression in rat brain *in vitro* (Kawamura et al., 2003a). The density of σ_1 receptors significantly increased with age, a finding that was confirmed in a PET study in monkeys (Kawamura et al., 2003b), but not in rat brain *in vivo* by Ramakrishnan et al. (2015), who showed a decrease in BP in several brain regions in aged rats.

Mishina et al. (2005), a clinical study compared [^{11}C]SA4503 binding in healthy volunteers and Parkinson's disease patients, and found no difference between controls and patients but a significant reduction in BP in the more injured side of the anterior putamen in patients, as assessed by [^{11}C]CFT binding. Quantitative analysis of σ_1 receptors in the human brain using [^{11}C]SA4503 was reported in Sakata et al. (2007). Another study was performed in AD patients: compared to elderly volunteers, AD patients had lower BP in the cortex and cerebellum (Mishina et al., 2008). The high occupancy of σ_1 receptors by the SSRI fluvoxamine and not by paroxetine (Ishikawa et al., 2007) and high occupancy by the AChEI donepezil (Ishikawa et al., 2009) were demonstrated in living human brain at therapeutic doses. Several fluorinated analogs of [^{11}C]SA4503 were synthesized and evaluated, including [^{18}F]FE-SA4503 (Elsinga et al., 2002, 2004), which is non-selective for the different subtypes of sigma

receptor, [^{18}F]FE-SA5845, less favorable in terms of kinetics, and [^{18}F]FM-SA4503, which showed high specific binding and is more selective of σ_1 receptors (Kawamura et al., 2007).

WHAT IS DIFFERENT WITH ANTAGONIST RADIOTRACERS?

Here, we propose to discuss the *in vivo* differences between agonist and antagonist radiotracers. The initial concept supporting the use of agonists as radiotracers is based on their preference for the high-affinity state of GPCR receptors as opposed to the total population of receptors, as observed *in vitro*. This concept should be associated to obvious differences between agonists and antagonists, such as differential sensitivity to competition with various ligands, to pharmacological alterations of G-protein/receptor coupling and to pathological alterations. Although the issue is likely to be much more complex *in vivo*, and it has proved difficult to demonstrate the existence of different coupling states of GPCR receptors in living organisms, a number of studies did highlight the above-mentioned differences. In addition, some data even suggest distinct brain distribution patterns between agonist and antagonist radiotracers for certain GPCR.

In vivo Binding of Agonists Versus Antagonists

According to *in vitro* data, agonist radiotracers are expected to display lower specific binding and available receptor density than reference antagonist radiotracers. Some studies directly compared the BP (B_{max}/K_d) of an agonist and an antagonist radiotracer specific for the same target in the same subjects. For instance, Kodaka et al. (2012) compared the binding potentials of the D_2/D_3 receptor radiotracers [^{11}C]MNPA and [^{11}C]raclopride in two humans, showing that the agonist's binding potential was about four times lower than the antagonist's. The BP ratio between the two radiotracers was highly reproducible on test–retest, and was suggested as a possible estimate of the proportion of receptors in high-affinity state as compared to overall D_2/D_3R density. A similar approach was used for 5-HT_{1A} receptors, using the partial agonist [^{11}C]CUMI-101 and the antagonist [^{11}C]WAY-100635 in non-human primates (Kumar et al., 2012). The authors reported an average 45% lower binding potential for [^{11}C]CUMI-101, with some regional variations (highest proportion of coupled receptors in the parahippocampal gyrus, and lowest in the amygdala and putamen). Another study in marmosets, comparing the full 5-HT_{1A} agonist [^{18}F]F13714 and the antagonist [^{18}F]MPPF, showed that antagonist binding potential was approximatively threefold higher in 5-HT_{1A}R-rich regions (such as hippocampus and amygdala), whereas in striatum and thalamus BP_{ND} levels were similar between the two tracers (Yokoyama et al., 2016). These regional variations in the proportion of 5-HT_{1A}R in high-affinity state were even greater in conscious animals. Taken together, these studies advocate differential targeting of GPCR receptors by agonists, which display lower binding potential likely because they bind preferentially to high-affinity receptor states. Therefore, if both tracers are available for a given GPCR, the proportion of highly effective receptors can be determined as compared to overall receptor density, in physiological or pathological conditions. However, interpretation of the above results is limited by a number of factors.

Firstly, comparison of binding potentials reflects the differences in B_{max}/K_d ratio rather than B_{max} directly; although the affinity of radiotracers is classically known from *in vitro* binding studies, the actual *in vivo* affinity can differ significantly. Unfortunately, very few studies directly compared the *in vivo* density of receptors targeted by an agonist versus an antagonist radiotracer. Using Scatchard analyses of PET data in 2 cats, Ginovart et al. (2006a) estimated the B_{max} of the agonist [^{11}C]PHNO to be similar to that of [^{11}C]raclopride, casting doubt on differential binding of agonist/antagonist radiotracers *in vivo*. On the other hand, the B_{max} of [^{11}C]NPA was shown to be about 79% of that of [^{11}C]raclopride in baboon (Narendran, 2005).

Another problem in comparing agonists and antagonists is the selectivity of the compounds: it is rather common for them not to be fully selective for a given GPCR, complicating the interpretation of results. This is precisely the case concerning [^{11}C]PHNO, which has higher affinity for the D_3R receptor subtype than other dopaminergic radiotracers (Narendran et al., 2006). Consequently, most clinical findings using this radiotracer were interpreted in terms of D_3R alterations rather than D2/D3R coupling state. Another example is the 5-HT_{2A}R agonist radiotracer [^{11}C]Cimbi-36, which displayed lower binding than the antagonist [^{11}C]MDL-100907 in cortical regions in rhesus monkey, but not in the hippocampus or choroid plexus, due to significant binding to 5-HT_{2C} receptors (Finnema et al., 2014). In human brain, [^{11}C]Cimbi-36 provided BPs that were comparable to (in cortical regions) or higher than (in 5-HT_{2C}R-rich regions) the antagonist [^{18}F]altanserin (Ettrup et al., 2016). Estimated B_{avail} values (knowing the plasma protein binding of each tracer and the *in vitro* affinities of each ligand) were also similar. Finally, the partial μ opioid receptor agonist [^{11}C]carfentanil and the antagonist [^{11}C]diprenorphine were also compared in baboons (Shiue et al., 1991) and humans (Frost et al., 1990): the greater uptake of [^{11}C]diprenorphine in the striatum or cingulate cortex was explained by its significant affinity for other opioid receptor subtypes or different kinetic properties compared to [^{11}C]carfentanil. In this regard, it is obvious that direct comparison of agonist and antagonist radiotracers can also be hindered by large differences in the kinetic parameters K_1, k_2, k_3 and k_4, especially as different modeling approaches may be needed to quantify BP.

Considering the existence of two affinity sites for the agonist, the kinetics of displacement by endogenous neurotransmitters or exogenous drugs differs between agonist and antagonist radiotracers. This is the case for [^{11}C]raclopride and [^{11}C]NPA, where quantitative autoradiography showed biphasic displacement for the agonist and monophasic displacement for the antagonist with increasing concentration of LSD (Minuzzi and Cumming, 2010). This phenomenon introduces another degree of complexity in comparing antagonist and agonist displacement in pharmacological challenge. Furthermore, it was

demonstrated that activated 5-HT_{1A} receptors induced a specific dynamics on the cell surface *in vivo,* which can modify *in vivo* receptor distribution (Pucadyil and Chattopadhyay, 2007). This could explain the difference between agonist and antagonist radiotracers and also the frequent discrepancies between *in vitro* and *in vivo* data.

As the occupancy of a GPCR by its specific endogenous neurotransmitter is expected to be greater in the high- than in the low-affinity state, the estimated B_{avail} value for an agonist may be closer to the B_{avail} value for an antagonist than the theoretical B_{max} values, which adds another level of complexity in comparing agonists versus antagonists. Therefore, considering the number of parameters that influence radiotracer binding quantification *in vivo*, it seems reasonable to conclude that it will generally be difficult to calculate directly the ratio of coupled receptors to total receptors density reliably enough to provide meaningful pathophysiological information. Likewise, simply comparing binding potentials or even B_{avail} between agonist and antagonist radiotracers in physiological conditions is unlikely to answer the question of the actual existence of a high-affinity GPCR state *in vivo*.

Greater Sensitivity to Neurotransmitter Release?

The dopamine system is the system most widely explored in terms of neurotransmitter release monitoring using PET (Finnema et al., 2015). Several PET radioligands of D_2/D_3 receptors are sensitive to dopamine release, such as the benzamide derivative [^{11}C]raclopride, an antagonist that has been extensively used to evaluate changes in dopamine release in the striatum, providing new insights into the role of dopamine in pathological and physiological conditions. Other antagonists with higher D_2 affinity, such as [^{11}C]FLB-457 and [^{18}F]fallypride, have been used to monitor extracellular dopamine fluctuations in extrastriatal regions where the density of D_2 receptors is lower. In theory, the sensitivity of these radioligands is limited by the fact that endogenous dopamine preferentially targets the high-affinity state of D_2/D_3 receptors, which is only a part of total receptor density as measured by antagonist radiotracers (Laruelle, 2000). It was demonstrated that agonist radiotracers of D_2/D_3 receptors such as [^{11}C]MNPA, [^{11}C]NPA and [^{11}C]PHNO were even more sensitive to DA release, both in animals (Ginovart et al., 2006a; Gallezot et al., 2014 for [^{11}C]PHNO; Narendran et al., 2004 for [^{11}C]NPA; Seneca et al., 2006; Skinbjerg et al., 2010 for [^{11}C]MNPA and humans Narendran et al., 2010; Shotbolt et al., 2012; Caravaggio et al., 2014). These experiments determined the proportion of high- and low-affinity states of D2/D3 receptors by means of amphetamine challenge or Scatchard analysis (**Table 1**).

Of the numerous attempts to develop a radiotracer sensitive to serotonin release, only a few experiments with [^{11}C]CUMI-101 (Milak et al., 2011) ([^{18}F]F13640 (Vidal et al., 2018) and [^{11}C]Cimbi36 (Jorgensen et al., 2017; Yang et al., 2017) showed sensitivity. These difficulties suggest notable differences between dopamine and serotonin competition systems: degree of receptor availability, proportion of high-affinity state receptors, and size of the accessible receptor pool (Paterson et al., 2010). However, agonist radiotracers seem to be more appropriate than antagonist radiotracers to evaluate neurotransmitter release. For example, the literature does not report significant sensitivity for the 5-HT_{1A} receptor antagonist [^{18}F]MPPF, but only then in the case of a huge release of serotonin (Zimmer et al., 2002; Rbah et al., 2003), suggesting a small proportion of coupled receptors in basal state (Udo de Haes et al., 2006). Higher sensitivity to neurotransmitter release than for antagonist radiotracers was also suggested *in vivo* for [^{11}C]GR103545 (for complete details, see **Table 1**). However, in pharmacological challenge paradigms, many agonist radiotracers lack direct comparison with antagonist radiotracers.

Finally, the effect of anesthesia has to be taken into account, particularly in preclinical studies. As observed by several teams, anesthesia is also responsible for changes in cerebral blood flow, receptor affinity and, finally, neurotransmission (Tsukada et al., 2002; Hassoun et al., 2003; Yokoyama et al., 2016). More precisely, it is also known to affect GPCR coupling (Seeman and Kapur, 2003). *In vivo* experiments on conscious subjects are consequently recommended, but assessment of such a protocol is not always possible in animals. Quick translation to human experiments is therefore desirable. Further investigation must be envisaged to explore the *in vivo* behavior of agonist and antagonist radioligands. This will certainly affect the current ligand-receptor paradigm.

The Concept of Internalization

Internalization is a phenomenon that is induced by agonist stimulation. Briefly, variations in the neurotransmitter, especially increasing levels in the synapse, can influence receptor crossing from cell surface to intracellular compartment. This has been demonstrated for dopamine, serotonin (Riad et al., 2001), muscarinic (Keith et al., 1998) mu opioid receptors (Quelch et al., 2014), and α_2 receptors (Olli-Lähdesmäki et al., 1999). This adaptive process can interfere with the binding of agonist radiotracers, especially in pharmacological challenge, which induces a massive release of neurotransmitter into the synapse. Thus, the observed decrease in binding following pharmacological challenge could be due to internalization more than to direct competition (Zimmer et al., 2004; Ginovart, 2005). Consequently, the level of lipophilicity could explain differences in ligand binding: lipophilic radioligands bind both free and sequestered receptors, whereas hydrophilic ligands bind receptors only at the cell surface (Aznavour et al., 2006).

For example, it has be proven that, after amphetamine challenge, the acute effect of neurotransmitter release is responsible for a large decrease in the levels of both types of radiotracer (Narendran et al., 2004; Ginovart et al., 2006a; Seneca et al., 2006). In the case of [^{11}C]MNPA and [^{18}F]fallypride, an antagonist, amplitude was greater for the agonist. On a short time-scale, the phenomenon of displacement was dominant; then, on a longer scale, internalization caused incomplete recovery of both radiotracers (Skinbjerg et al., 2010). However, [^{18}F]fallypride is known to bind internalized receptors with affinity twofold lower than free receptors. Consequently, [^{18}F]fallypride was also affected by internalization. The process of internalization remains unclear: Narendran et al. (2004) found

no difference between NPA and raclopride in recovery time after amphetamine challenge.

In the case of 5-HT_{2A} receptors, Ettrup et al. (2010) found no differences in binding between the agonist [^{11}C]Cimbi36 and the antagonist [^{18}F]altanserin. They found a correlation between BP_{nd} for both radiotracers. B_{avail} was almost the same (164 for the agonist and 173 for the antagonist). But these results were not in agreement with *in vitro* data suggesting internalization of 80% of receptors.

The Case of Biased Agonism

G protein-coupled receptors display two different states, an active state (coupled receptor) and an inactive state (non-coupled receptor), and it was demonstrated *in vitro* that a given receptor may be coupled to different subtypes of G protein (Offermanns et al., 1994; Laugwitz et al., 1996) depending on its location in the brain (Jin et al., 2001). In this context, studies demonstrated that an agonist can selectively trigger a single transduction pathway among the numerous transduction pathways of GPCR (Berg and Clarke, 2006; Kenakin, 2015; Luttrell et al., 2015). Consequently, agonist ligands for a single target provide their own functional signature by selecting a specific transduction pathway. This biased agonism is related to allosteric modification of the receptor defined by multiple conformations, each depending on ligand interaction with signaling proteins (Berg and Clarke, 2006; Kenakin and Christopoulos, 2012). In this context, Yokoyama et al. (2016) compared agonist and antagonist radiotracers on 5-HT_{1A} receptors in non-human primates. The binding of the biased agonist [^{18}F]F13714 was not only lower than [^{18}F]MPPF but very different. Although images revealed binding all consistent with 5-HT_{1A} receptor distribution (cortical regions, amygdala, hypothalamus, and raphe nucleus), there were notable differences in intensity : e.g., lower in hippocampus and amygdala and higher in the cingulate and insular cortices for the agonist radiotracer. [^{18}F]MPPF showed twofold higher binding in the hippocampus and amygdala. The authors attributed these differences to the biased agonism of F13714, interacting with specific G protein subtypes and targeting a specific brain region composed of presynaptic receptors: raphe striatum and thalamus. The notion of biased agonism was also recently explored by PET/MR imaging, and contributes to defining the existence of biased agonism on 5-HT_{1A} receptors (Vidal et al., 2018). In the kappa-opioid receptor, differences in the dynamics of receptor structure induced by the agonist [^{11}C]GR103545 versus the antagonists [^{11}C]LY2795050 and [^{11}C]LY2459989 were used to explain the *in vivo* discrepancies observed on PET imaging (Placzek et al., 2018). Biased agonism requires exploring different transduction pathways composed of a single receptor and is a key point in the hypothetical *in vivo* differences between agonist and antagonist radiotracers. *In vitro* data clearly show the existence of two different affinity states for GPCR, but there are still difficulties in demonstrating this on PET imaging, suggesting that there may be multiple receptor conformations rather than just two affinity sites. Going further, it was also demonstrated that some 5-HT_{2A} antagonists are able to trigger arrestin pathways and induce paradoxical desensitization of GPCR (Gray and Roth, 2001).

WHAT IS THE ROLE OF PET AGONISTS IN NEUROIMAGING?

Improving the Measure of Endogenous Neurotransmitter Release

It is assumed from the *in vitro* data that antagonists are less sensitive to neurotransmitter release than agonists. Agonists bind only to high-affinity state receptors, whereas antagonists bind to both high- and low-affinity state receptors equally. Therefore, when initiating competition, the antagonist is not effectively involved (Paterson et al., 2010; Finnema et al., 2015). On the other hand, agonist radiotracers provide direct estimation of the target affinity of endogenous neurotransmitters (Narendran et al., 2004). Considering pharmacological findings suggesting that agonists are more sensitive to neurotransmitter release, it is of great interest to test this hypothesis *in vivo*. However, as seen before, it is difficult to demonstrate high sensitivity; experimental conditions are a determining factor. Measuring neurotransmitter release involves knowing the exact neurotransmitter level, by microdialysis. The endogenous levels are too low to be estimated at baseline with a radiotracer (Finnema et al., 2015), and it is necessary to perform pharmacological challenge to obtain huge neurotransmitter release. The development of modeling of neurotransmitter release contributes to understanding these mechanisms (Normandin et al., 2012).

Precision Pharmacology to Evaluate Neurologic Disorders and New Therapeutics

Agonist radiotracers are useful tools to develop new agonist drug candidates. In this context, it seems to be more appropriate to choose the same type of ligand when performing drug-occupancy studies. Also, in activation studies it is possible to visualize the impact of drug or task on the active population of receptors. Therefore, there is great interest in testing this clinically. Although this has not yet been formally demonstrated, it can be proposed that pathological conditions lead to a specific decoupling of GCPRs, leading to a functional deficit of neurotransmission. PET imaging by radiopharmaceutical agonists may enable precise definition of which GPCR pathways are damaged in CNS disorders and which pathways are still functional.

Firstly, it is possible to evaluate the difference in basal binding between control and pathologic conditions. Secondly, basal binding can contribute to therapeutic optimization of a drug and of early drug development by using the drug occupancy paradigm. However, for example, a study on cynomolgus monkeys found no differences in drug occupancy of apomorphine measured with [^{11}C]raclopride or [^{11}C]MNPA (Finnema et al., 2009). On the other hand, an *ex vivo* study showed that the D_2 agonist NPA was more effective in detecting an increase in receptor availability in the early stages of Parkinson's disease. Likewise, concerning 5-HT_{1A} receptors in a postmortem study in Alzheimer patients, the radiolabeled agonist F13640 was more effective in detecting transient over-expression

of 5-HT_{1A} receptors, followed by functional decoupling of these same receptors, before a decrease in their total density at a later Braak stage (Vidal et al., 2016).

In therapeutics, it could be possible to stimulate only specific pathways with biased agonists, to offset GPCR damage in brain. Thus, it appears that agonist radiotracers could be useful for developing precision pharmacology (Schaffhausen, 2017), with numerous applications in pharmacotherapeutics. In any case, it is now recommended to confirm these hypotheses with *in vivo* PET studies.

Future Challenges and Conclusion

Agonist radiotracers provide many opportunities to decipher the ligand-GPCR paradigm in neuropharmacology. It is possible to pursue *in vitro* findings with an *in vivo* design. The concomitant use of antagonist and agonist radiotracers sheds light on complex phenomena such as reversible conversion of high- to low-affinity receptors and internalization. However, the existence of two receptor affinity states has not yet been clearly demonstrated *in vivo* (Finnema et al., 2010; Skinbjerg et al., 2012). There are discrepancies between *in vitro* and *in vivo* findings, certainly because the *in vivo* environment of the neuron is complex. Study conditions are also a determining factor. Anesthesia or changes in blood flow modify radiotracer binding. There is also great variability in the methods used to quantify high-affinity receptors *in vitro* and *in vitro* (Richfield et al., 1986; De Haes, 2005; Shalgunov, 2017). The notion of biased agonism introduces more complexity in molecular effects of agonists. A combination of PET and MRI may shed light on agonist functional activities (Vidal et al., 2018). Finally, there is a need to develop new tools to demonstrate *in vivo* coupling of GPCR. Indeed, the binding of an agonist radioligand involves intracellular molecular remodeling, which is probably not the case with the binding of a "silent" antagonist. These differences in docking justify that the brain images of agonists, and in particular their distribution patterns, are not directly comparable to those currently obtained by PET imaging of receptors using mainly antagonists. It is therefore necessary to develop new models for interpreting this molecular and functional imaging of receptors. The interpretation of the models will be based in particular on the implementation of PET imaging studies that will compare the binding patterns of an antagonistic radiotracer and an agonist radiotracer directed toward the same receptor in the same subject. Studies on animal models will also provide valuable information, in particular by pharmacologically modulating the G-protein coupling state of receptors during PET acquisitions. Finally, molecular modeling, whose bioinformatics tools are constantly evolving, will make it possible to simulate the docking specificity of agonist molecules in receptor molecular niches.

All these new tools will lead to new paradigms for neuroimaging which, in turn, will contribute to new advances in neurology and psychiatry.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LZ initiated the research topic of the manuscript, proposed its initial plan and made its revision. MC and BV wrote the manuscript.

FUNDING

This work was performed within the framework of the LABEX PRIMES (ANR-11-LABX-0063) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00255/full#supplementary-material

REFERENCES

Addy, C., Wright, H., Van Laere, K., Gantz, I., Erondu, N., Musser, B. J., et al. (2008). The Acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab.* 7, 68–78. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.012

Ahmad, R., Goffin, K., Van den Stock, J., De Winter, F.-L., Cleeren, E., Bormans, G., et al. (2014). *In vivo* type 1 cannabinoid receptor availability in Alzheimer's disease. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 242–250. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.10.002

Albizu, L., Moreno, J. I., Gonzalez-Maeso, J., and Sealfon, S. C. (2010). Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 636–650. doi: 10.2174/187152710793361586

Avissar, S., and Schreiber, G. (2006). The involvement of G proteins and regulators of receptor–G protein coupling in the pathophysiology, diagnosis and treatment of mood disorders. *Clin. Chim. Acta* 366, 37–47. doi: 10.1016/j.cca.2005.11.003

Aznavour, N., Rbah, L., Riad, M., Reilhac, A., Costes, N., Descarries, L., et al. (2006). A PET imaging study of 5-HT_{1A} receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. *Neuroimage* 33, 834–842. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.08.012

Battaglia, G., Shannon, M., and Titeler, M. (1984). Guanyl nucleotide and divalent cation regulation of cortical S 2 serotonin receptors. *J. Neurochem.* 43, 1213–1219. doi: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb05375.x

Becker, G., Streichenberger, N., Billard, T., Newman-Tancredi, A., and Zimmer, L. (2014). A postmortem study to compare agonist and antagonist 5-HT1A receptor-binding sites in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 930–934. doi: 10.1111/cns.12306

Bencherif, B., Fuchs, P., Sheth, R., Dannals, R., Campbell, J., and Frost, J. (2002). Pain activation of human supraspinal opioid pathways as demonstrated by [11C]carfentanil and positron emission tomography (PET). *Pain* 99, 589–598. doi: 10.1016/s0304-3959(02)00266-x

Bencherif, B., Guarda, A. S., Colantuoni, C., Ravert, H. T., Dannals, R. F., and Frost, J. J. (2005). Regional mu-opioid receptor binding in insular cortex is decreased in bulimia nervosa and correlates inversely with fasting behavior. *J. Nucl. Med.* 46, 1349–1351.

Bencherif, B., Wand, G. S., McCaul, M. E., Kim, Y. K., Ilgin, N., Dannals, R. F., et al. (2004). Mu-opioid receptor binding measured by [11C]carfentanil positron emission tomography is related to craving and mood in alcohol

dependence. *Biol. Psychiatry* 55, 255–262. doi: 10.1016/j.biopsych.2003.07.007

Benson, B., Carson, R., Kiesewetter, D., Herscovitch, P., Eckelman, W., Post, R., et al. (2004). A potential cholinergic mechanism of procaine's limbic activation. *Neuropsychopharmacology* 29, 1239–1250. doi: 10.1038/sj.npp.1300404

Berg, K. A., and Clarke, W. P. (2006). Development of functionally selective agonists as novel therapeutic agents. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* 3, 421–428. doi: 10.1016/j.ddstr.2006.10.017

Berg, K. A., and Clarke, W. P. (2018). Making sense of pharmacology: inverse agonism and functional selectivity. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 962–977. doi: 10.1093/ijnp/pyy071

Björk, K., and Svenningsson, P. (2011). Modulation of monoamine receptors by adaptor proteins and lipid rafts: role in some effects of centrally acting drugs and therapeutic agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 211–242. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100520

Boileau, I., Guttman, M., Rusjan, P., Adams, J. R., Houle, S., Tong, J., et al. (2009). Decreased binding of the D3 dopamine receptor-preferring ligand [11C]-(+)-PHNO in drug-naive Parkinson's disease. *Brain* 132, 1366–1375. doi: 10.1093/brain/awn337

Braden, M. R., Parrish, J. C., Naylor, J. C., and Nichols, D. E. (2006). Molecular interaction of serotonin 5-HT2A receptor residues Phe339(6.51) and Phe340(6.52) with superpotent N-Benzyl phenethylamine agonists. *Mol. Pharmacol.* 70, 1956–1964. doi: 10.1124/mol.106.028720

Bruchas, M. R., Yang, T., Schreiber, S., Defino, M., Kwan, S. C., Li, S., et al. (2007). Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 29803–29811. doi: 10.1074/jbc.M705540200

Burns, H. D., Van Laere, K., Sanabria-Bohorquez, S., Hamill, T. G., Bormans, G., Eng, W.-S., et al. (2007). [18F]MK-9470, a positron emission tomography (PET) tracer for *in vivo* human PET brain imaging of the cannabinoid-1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9800–9805. doi: 10.1073/pnas.0703472104

Campbell, C. M., Bounds, S. C., Kuwabara, H., Edwards, R. R., Campbell, J. N., Haythornthwaite, J. A., et al. (2013). individual variation in sleep quality and duration is related to cerebral mu opioid receptor binding potential during tonic laboratory pain in healthy subjects. *Pain Med. Malden Mass* 14, 1882–1892. doi: 10.1111/pme.12231

Cannon, D., Carson, R., Nugent, A., Eckelman, W., Kiesewetter, D., Williams, J., et al. (2006). Reduced muscarinic type 2 receptor binding in subjects with bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 63:741. doi: 10.1001/archpsyc.63.7.741

Cannon, D. M., Klaver, J. K., Gandhi, S. K., Solorio, G., Peck, S. A., Erickson, K., et al. (2011). Genetic variation in cholinergic muscarinic-2 receptor gene modulates M2 receptor binding *in vivo* and accounts for reduced binding in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 16, 407–418. doi: 10.1038/mp.2010.24

Caravaggio, F., Chung, J., Gerretsen, P., Fervaha, G., Nakajima, S., Plitman, E., et al. (2016). Exploring the relationship between social attachment and dopamine D 2/3 receptor availability in the brains of healthy humans using. *Soc. Neurosci.* 12, 163–173. doi: 10.1080/17470919.2016.1152997

Caravaggio, F., Nakajima, S., Borlido, C., Remington, G., Gerretsen, P., Wilson, A., et al. (2014). Estimating endogenous dopamine levels at D2 and D3 receptors in humans using the agonist radiotracer [(11)C]-(+)-PHNO. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 2769–2776. doi: 10.1038/npp.2014.125

Carson, R. E., Kiesewetter, D. O., Jagoda, E., Der, M. G., Herscovitch, P., and Eckelman, W. C. (1998). Muscarinic cholinergic receptor measurements with [^{18}F]FP-TZTP: control and competition studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1130–1142. doi: 10.1097/00004647-199810000-00010

Casteels, C., Bormans, G., and Van Laere, K. (2010a). The effect of anaesthesia on [(18)F]MK-9470 binding to the type 1 cannabinoid receptor in the rat brain. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 1164–1173. doi: 10.1007/s00259-010-1383-7

Casteels, C., Lauwers, E., Baitar, A., Bormans, G., Baekelandt, V., and Van Laere, K. (2010b). *In vivo* type 1 cannabinoid receptor mapping in the 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1316, 153–162. doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.026

Casteels, C., Martinez, E., Bormans, G., Camon, L., de Vera, N., Baekelandt, V., et al. (2010c). Type 1 cannabinoid receptor mapping with [18F]MK-9470 PET in the rat brain after quinolinic acid lesion: a comparison to dopamine receptors and glucose metabolism. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 2354–2363. doi: 10.1007/s00259-010-1574-2

Casteels, C., Vanbilloen, B., Vercammen, D., Bosier, B., Lambert, D. M., Bormans, G., et al. (2010d). Influence of chronic bromocriptine and levodopa administration on cerebral type 1 cannabinoid receptor binding. *Synapse* 64, 617–623. doi: 10.1002/syn.20769

Casteels, C., Gérard, N., van Kuyck, K., Pottel, L., Nuttin, B., Bormans, G., et al. (2014). Small animal PET imaging of the type 1 cannabinoid receptor in a rodent model for anorexia nervosa. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 41, 308–321. doi: 10.1007/s00259-013-2522-8

Casteels, C., Koole, M., Celen, S., Bormans, G., and Van Laere, K. (2012). Preclinical evaluation and quantification of [18F]MK-9470 as a radioligand for PET imaging of the type 1 cannabinoid receptor in rat brain. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39, 1467–1477. doi: 10.1007/s00259-012-2163-3

Casteels, C., Vandeputte, C., Rangarajan, J. R., Dresselaers, T., Riess, O., Bormans, G., et al. (2011). Metabolic and type 1 cannabinoid receptor imaging of a transgenic rat model in the early phase of Huntington disease. *Exp. Neurol.* 229, 440–449. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.03.014

Ceccarini, J., Ahmad, R., Van de Vliet, L., Casteels, C., Vandenbulcke, M., Vandenberghe, W., et al. (2019). Behavioral symptoms in premanifest huntington disease correlate with reduced frontal CB 1 R levels. *J. Nucl. Med.* 60, 115–121. doi: 10.2967/jnumed.118.210393

Ceccarini, J., Hompes, T., Verhaeghen, A., Casteels, C., Peuskens, H., Bormans, G., et al. (2014). Changes in cerebral CB1 receptor availability after acute and chronic alcohol abuse and monitored abstinence. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 2822–2831. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0849-13.2014

Ceccarini, J., Kuepper, R., Kemels, D., van Os, J., Henquet, C., and Van Laere, K. (2013). MK-9470 PET measurement of cannabinoid CB1receptor availability in chronic cannabis users. *Addict. Biol.* 20, 357–367. doi: 10.1111/adb.12116

Ceccarini, J., Kuepper, R., Kemels, D., van Os, J., Henquet, C., and Van Laere, K. (2015). [18 F]MK-9470 PET measurement of cannabinoid CB 1 receptor availability in chronic cannabis users: CB 1 receptor in cannabis users. *Addict. Biol.* 20, 357–367. doi: 10.1111/adb.12116

Ceccarini, J., Weltens, N., Ly, H. G., Tack, J., Van Oudenhove, L., and Van Laere, K. (2016). Association between cerebral cannabinoid 1 receptor availability and body mass index in patients with food intake disorders and healthy subjects: a [18F]MK-9470 PET study. *Transl. Psychiatry* 6:e853. doi: 10.1038/tp.2016.118

Cleeren, E., Casteels, C., Goffin, K., Koole, M., Van Laere, K., Janssen, P., et al. (2018). Positron emission tomography imaging of cerebral glucose metabolism and type 1 cannabinoid receptor availability during temporal lobe epileptogenesis in the amygdala kindling model in rhesus monkeys. *Epilepsia* 59, 959–970. doi: 10.1111/epi.14059

Cohen, R., Carson, R., Filbey, F., Szczepanik, J., and Sunderland, T. (2006). Age and APOE-ε4 genotype influence the effect of physostigmine infusion on the in-vivo distribution volume of the muscarinic-2-receptor dependent tracer [18F] FP-TZTP. *Synapse* 60, 86–92. doi: 10.1002/syn.20276

Cohen, R. M., Podruchny, T. A., Bokde, A. L. W., Carson, R. E., Herscovitch, P., Kiesewetter, D. O., et al. (2003). Higher *in vivo* muscarinic-2 receptor distribution volumes in aging subjects with an apolipoprotein E-?4 allele. *Synapse* 49, 150–156. doi: 10.1002/syn.10225

Colasanti, A., Searle, G., Long, C., Hill, S., Reiley, R., Quelch, D., et al. (2012). Endogenous opioid release in the human brain reward system induced by acute amphetamine administration. *Biol. Psychiatry* 72, 371–377. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.01.027

Colom, M., Costes, N., Redouté, J., Dailler, F., Gobert, F., Le Bars, D., et al. (2019). 18F-F13640 PET imaging of functional receptors in humans. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* doi: 10.1007/s00259-019-04473-7 [Epub ahead of print].

Cumming, P., Gillings, N., Jensen, S., Bjarkam, C., and Gjedde, A. (2003). Kinetics of the uptake and distribution of the dopamine D2,3 agonist (R)-N-[1-11C]n-propylnorapomorphine in brain of healthy and MPTP-treated Göttingen miniature pigs. *Nucl. Med. Biol.* 30, 547–553. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00448-1

Cumming, P., Wong, D., Gillings, N., Hilton, J., Scheffel, U., and Gjedde, A. (2002). Specific binding of [11C]Raclopride and N-[3H]Propyl-norapomorphine to dopamine receptors in living mouse striatum: occupancy by endogenous dopamine and guanosine triphosphate-free G protein. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 596–604. doi: 10.1097/00004647-200205000-00011

Dannals, R., Ravert, H., James Frost, J., Wilson, A., Donald Burns, H., and Wagner, H. (1985). Radiosynthesis of an opiate receptor binding radiotracer: [11C]carfentanil. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 36, 303–306. doi: 10.1016/0020-708x(85)90089-4

DaSilva, A. F., Nascimento, T. D., DosSantos, M. F., Lucas, S., van HolsbeecK, H., DeBoer, M., et al. (2014a). Association of μ-Opioid activation in the prefrontal cortex with spontaneous migraine attacks - brief report I. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1, 439–444. doi: 10.1002/acn3.65

DaSilva, A. F., Nascimento, T. D., DosSantos, M. F., and Zubieta, J.-K. (2014b). Migraine and the Mu-opioidergic system-Can we directly modulate it? Evidence from neuroimaging studies. *Curr. Pain Headache Rep.* 18:429. doi: 10.1007/s11916-014-0429-0

De Haes, U. (2005). *In Vivo Imaging of Dopamine and Serotonin Release: Response to Psychopharmacological Challenges*. Master's thesis, University of Groningen, Groningen.

De Lean, A., Stadel, J. M., and Lefkowitz, R. J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108–7117.

Domino, E. F., Hirasawa-Fujita, M., Ni, L., Guthrie, S. K., and Zubieta, J. K. (2015). Regional brain [(11)C]carfentanil binding following tobacco smoking. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 59, 100–104. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.01.007

DosSantos, M., Martikainen, I., Nascimento, T., Love, T., Deboer, M., Maslowski, E., et al. (2012). Reduced basal ganglia μ-opioid receptor availability in trigeminal neuropathic pain: a pilot study. *Mol. Pain* 8:74. doi: 10.1186/1744-8069-8-74

Ehlert, F. J. (1985). The relationship between muscarinic receptor occupancy and adenylate cyclase inhibition in the rabbit myocardium. *Mol. Pharmacol.* 28, 410–421.

Elsinga, P., Kawamura, K., Kobayashi, T., Tsukada, H., Senda, M., Vaalburg, W., et al. (2002). Synthesis and evaluation of [18F] fluoroethyl SA4503 as a PET ligand for the sigma receptor. *Synapse* 43, 259–267. doi: 10.1002/syn.10045

Elsinga, P., Tsukada, H., Harada, N., Kakiuchi, T., Kawamura, K., Vaalburg, W., et al. (2004). Evaluation of [18F] fluorinated sigma receptor ligands in the conscious monkey brain. *Synapse* 52, 29–37. doi: 10.1002/syn.20001

Ernst, A. (1967). Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacologia* 10, 316–323. doi: 10.1007/bf00403900

Ettrup, A., da Cunha-Bang, S., McMahon, B., Lehel, S., Dyssegaard, A., Skibsted, A. W., et al. (2014). Serotonin 2A receptor agonist binding in the human brain with [11 C]Cimbi-36. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1188–1196. doi: 10.1038/jcbfm.2014.68

Ettrup, A., Hansen, M., Santini, M. A., Paine, J., Gillings, N., Palner, M., et al. (2011). Radiosynthesis and *in vivo* evaluation of a series of substituted 11C-phenethylamines as 5-HT2A agonist PET tracers. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38, 681–693. doi: 10.1007/s00259-010-1686-8

Ettrup, A., Palner, M., Gillings, N., Santini, M. A., Hansen, M., Kornum, B. R., et al. (2010). Radiosynthesis and evaluation of 11C-CIMBI-5 as a 5-HT2A receptor agonist radioligand for PET. *J. Nucl. Med.* 51, 1763–1770. doi: 10.2967/jnumed.109.074021

Ettrup, A., Svarer, C., McMahon, B., da Cunha-Bang, S., Lehel, S., Møller, K., et al. (2016). Serotonin 2A receptor agonist binding in the human brain with [11 C]Cimbi-36: test–retest reproducibility and head-to-head comparison with the antagonist [18 F]altanserin. *Neuroimage* 130, 167–174. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.02.001

Falcone, M., Gold, A. B., Wileyto, E. P., Ray, R., Ruparel, K., Newberg, A., et al. (2012). μ-Opioid receptor availability in the amygdala is associated with smoking for negative affect relief. *Psychopharmacology* 222, 701–708. doi: 10.1007/s00213-012-2673-5

Fan, H., Ravert, H., Holt, D., Dannals, R., and Horti, A. (2006). Synthesis of 1-(2,4-dichlorophenyl)-4-cyano-5-(4-[11C]methoxyphenyl)-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide ([11C]JHU75528) and 1-(2-bromophenyl)-4-cyano-5-(4-[11C]methoxyphenyl)-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide ([11C]JHU75575) as potential radioligands for PET imaging of cerebral cannabinoid receptor. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 49, 1021–1036. doi: 10.1002/jlcr.1125

Finnema, J. S., Bang-Andersen, B., Wikstrom, H. V., and Halldin, C. (2010). Current state of agonist radioligands for imaging of brain dopamine D2/D3 receptors *in vivo* with positron emission tomography. *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 1477–1498. doi: 10.2174/156802610793176837

Finnema, S., Halldin, C., Bang-Andersen, B., Gulyás, B., Bundgaard, C., Wikström, H., et al. (2009). Dopamine D(2/3) receptor occupancy of apomorphine in the nonhuman primate brain–a comparative PET study with [11C]raclopride and [11C]MNPA. *Synapse* 63, 378–389. doi: 10.1002/syn.20615

Finnema, S. J., Scheinin, M., Shahid, M., Lehto, J., Borroni, E., Bang-Andersen, B., et al. (2015). Application of cross-species PET imaging to assess neurotransmitter release in brain. *Psychopharmacology* 232, 4129–4157. doi: 10.1007/s00213-015-3938-6

Finnema, S. J., Seneca, N., Farde, L., Shchukin, E., Sóvágó, J., Gulyás, B., et al. (2005). A preliminary PET evaluation of the new dopamine D2 receptor agonist [11C]MNPA in cynomolgus monkey. *Nucl. Med. Biol.* 32, 353–360. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2005.01.007

Finnema, S. J., Stepanov, V., Ettrup, A., Nakao, R., Amini, N., Svedberg, M., et al. (2014). Characterization of [11C]Cimbi-36 as an agonist PET radioligand for the 5-HT2A and 5-HT2C receptors in the nonhuman primate brain. *Neuroimage* 84, 342–353. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.08.035

Frost, J., Douglass, K., Mayberg, H., Dannals, R., Links, J., Wilson, A., et al. (1989). Multicompartmental analysis of [11C]Carfentanil binding to opiate receptors in humans measured by positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 398–409. doi: 10.1038/jcbfm.1989.59

Frost, J., Mayberg, H., Fisher, R., Douglass, K., Dannals, R., Links, J., et al. (1988). Mu-opiate receptors measured by positron emission tomography are increased in temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 23, 231–237. doi: 10.1002/ana.410230304

Frost, J., Mayberg, H., Sadzot, B., Dannals, R., Lever, J., Ravert, H., et al. (1990). Comparison of [11C]Diprenorphine and [11C]Carfentanil binding to opiate receptors in humans by positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 484–492. doi: 10.1038/jcbfm.1990.90

Frost, J., Wagner, H., Dannals, R., Ravert, H., Links, J., Wilson, A., et al. (1985). Imaging opiate receptors in the human brain by positron tomography. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 9, 231–236. doi: 10.1097/00004728-198503000-00001

Fujio, M., Nagata, S., Kawamura, K., Sugiyama, N., Tanaka, H., Uno, K., et al. (2002). Synthesis and evaluation of 11C-labeled (S)-N-[1-(2-phenylethyl) pyrrolidin-2-yl]methyl-3-methylthiobenzamide as a PET 5-HT1A receptor ligand. *Nucl. Med. Biol.* 29, 657–663. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00305-0

Gallezot, J., Esterlis, I., Bois, F., Zheng, M., Lin, S., Kloczynski, T., et al. (2014). Evaluation of the sensitivity of the novel α4β2* nicotinic acetylcholine receptor PET radioligand 18 F-(-)-NCFHEB to increases in synaptic acetylcholine levels in rhesus monkeys. *Synapse* 68, 556–564. doi: 10.1002/syn.21767

Gao, M., Wang, M., and Zheng, Q. (2012). A new high-yield synthetic route to PET CB1 radioligands [11C]OMAR and its analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 3704–3709. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.030

Gao, Y., Baldessarini, R., Kula, N., and Neumeyer, J. (1990). Synthesis and dopamine receptor affinities of enantiomers of 2-substituted apomorphines and their N-n-propyl analogs. *J. Med. Chem.* 33, 1800–1805. doi: 10.1021/jm00168a040

Gérard, N., Ceccarini, J., Bormans, G., Vanbilloen, B., Casteels, C., Goffin, K., et al. (2010). Influence of chronic nicotine administration on cerebral type 1 cannabinoid receptor binding: an vivo micro-PET study rat using 18F 42, MK-9470. *J. Mol. Neurosci.* 42, 162–167. doi: 10.1007/s12031-010-9340-2

Gérard, N., Pieters, G., Goffin, K., Bormans, G., and Van Laere, K. (2011). Brain type 1 cannabinoid receptor availability in patients with anorexia and bulimia nervosa. *Biol. Psychiatry* 70, 777–784. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.05.010

Ghitza, U. E., Preston, K. L., Epstein, D. H., Kuwabara, H., Endres, C. J., Bencherif, B., et al. (2010). Brain mu-opioid receptor binding predicts treatment outcome in cocaine-abusing outpatients. *Biol. Psychiatry* 68, 697–703. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.05.003

Ginovart, N. (2005). Imaging the dopamine system with *in vivo* [11C]raclopride displacement studies: understanding the true mechanism. *Mol. Imaging Biol. Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 7, 45–52. doi: 10.1007/s11307-005-0932-0

Ginovart, N., Galineau, L., Willeit, M., Mizrahi, R., Bloomfield, P., Seeman, P., et al. (2006a). Binding characteristics and sensitivity to endogenous dopamine of [11C](+)-PHNO, a new agonist radiotracer for imaging the high-affinity state of D2 receptors *in vivo* using positron emission tomography. *J. Neurochem.* 97, 1089–1103. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03840.x

Ginovart, N., Willeit, M., Rusjan, P., Graff, A., Bloomfield, P., Houle, S., et al. (2006b). Positron emission tomography quantification of [11C](+)-PHNO binding in the human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 857–871. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600411

Goffin, K., Bormans, G., Casteels, C., Bosier, B., Lambert, D., Grachev, I., et al. (2008). An *in vivo* [18F] MK-9470 microPET study of type 1 cannabinoid receptor binding in Wistar rats after chronic administration of valproate and levetiracetam. *Neuropharmacology* 54, 1103–1106. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.02.018

Goffin, K., Van Paesschen, W., and Van Laere, K. (2011). *In vivo* activation of endocannabinoid system in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain* 134, 1033–1040. doi: 10.1093/brain/awq385

Golan, M., Schreiber, G., and Avissar, S. (2011). Antidepressants elevate GDNF expression and release from C6 glioma cells in a β-arrestin1-dependent, CREB interactive pathway. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 1289–1300. doi: 10.1017/S1461145710001550

Gorelick, D. A., Kim, Y. K., Bencherif, B., Boyd, S. J., Nelson, R., Copersino, M., et al. (2005). Imaging brain mu-opioid receptors in abstinent cocaine users: time course and relation to cocaine craving. *Biol. Psychiatry* 57, 1573–1582. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.02.026

Gorelick, D. A., Kim, Y. K., Bencherif, B., Boyd, S. J., Nelson, R., Copersino, M. L., et al. (2008). Brain mu-opioid receptor binding: relationship to relapse to cocaine use after monitored abstinence. *Psychopharmacology* 200, 475–486. doi: 10.1007/s00213-008-1225-5

Gozlan, H., Thibault, S., Laporte, A.-M., Lima, L., and Hamon, M. (1995). The selective 5-HT1A antagonist radioligand [3H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT1A receptors in rat brain membranes. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 288, 173–186. doi: 10.1016/0922-4106(95)90192-2

Graff-Guerrero, A., Mizrahi, R., Agid, O., Marcon, H., Barsoum, P., Rusjan, P., et al. (2008). The dopamine D2 receptors in high-affinity state and d3 receptors in schizophrenia: a clinical [11C](+)-PHNO PET Study. *Neuropsychopharmacology* 34, 1078–1086. doi: 10.1038/npp.2008.199

Gray, J. A., and Roth, B. L. (2001). Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT(2A) receptors by agonists and antagonists. *Brain Res. Bull.* 56, 441–451. doi: 10.1016/s0361-9230(01)00623-2

Greenwald, M., Johanson, C.-E., Bueller, J., Chang, Y., Moody, D. E., Kilbourn, M., et al. (2007). Buprenorphine duration of action: mu-opioid receptor availability and pharmacokinetic and behavioral indices. *Biol. Psychiatry* 61, 101–110. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.04.043

Gullapalli, S., Amrutkar, D., Gupta, S., Kandadi, M. R., Kumar, H., Gandhi, M., et al. (2010). Characterization of active and inactive states of CB1 receptor and the differential binding state modulation by cannabinoid agonists, antagonists and inverse agonists. *Neuropharmacology* 58, 1215–1219. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.03.001

Hagelberg, N., Aalto, S., Tuominen, L., Pesonen, U., Någren, K., Hietala, J., et al. (2012). Striatal μ-opioid receptor availability predicts cold pressor pain threshold in healthy human subjects. *Neurosci. Lett.* 521, 11–14. doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.042

Halldin, C., Farde, L., Litton, J., Hall, H., and Sedvall, G. (1992). [11C]Ro 15-4513, a ligand for visualization of benzodiazepine receptor binding. *Psychopharmacology* 108, 16–22. doi: 10.1007/bf02245279

Halldin, C., Gulyas, B., and Farde, L. (2001). PET studies with carbon-11 radioligands in neuropsychopharmacological drug development. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1907–1929. doi: 10.2174/1381612013396871

Hamill, T., Sato, N., Jitsuoka, M., Tokita, S., Sanabria, S., Eng, W., et al. (2009). Inverse agonist histamine H3 receptor PET tracers labelled with carbon-11 or fluorine-18. *Synapse* 63, 1122–1132. doi: 10.1002/syn.20689

Harris, R. E., Zubieta, J.-K., Scott, D. J., Napadow, V., Gracely, R. H., and Clauw, D. J. (2009). Traditional Chinese acupuncture and placebo (sham) acupuncture are differentiated by their effects on mu-opioid receptors (MORs). *Neuroimage* 47, 1077–1085. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.05.083

Hassoun, W., Le Cavorsin, M., Ginovart, N., Zimmer, L., Gualda, V., Bonnefoi, F., et al. (2003). PET study of the [^{11}C]raclopride binding in the striatum of the awake cat: effects of anaesthetics and role of cerebral blood flow. *Eur. J. Nuclear Med. Mol. Imaging* 30, 141–148. doi: 10.1007/s00259-002-0904-4

Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., and Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 829–842. doi: 10.1038/nrd.2017.178

Heese, K. (2013). G Proteins, p60TRP, and neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 47, 1103–1111. doi: 10.1007/s12035-013-8410-1

Heinz, A., Reimold, M., Wrase, J., Hermann, D., Croissant, B., Mundle, G., et al. (2005). Correlation of stable elevations in striatal mu-opioid receptor availability in detoxified alcoholic patients with alcohol craving: a positron emission tomography study using carbon 11-labeled carfentanil. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 57–64. doi: 10.1001/archpsyc.62.1.57

Henriksen, G., Platzer, S., Hauser, A., Willoch, F., Berthele, A., Schwaiger, M., et al. (2005a). 18F-labeled sufentanil for PET-imaging of mu-opioid receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 1773–1777. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.02.049

Henriksen, G., Platzer, S., Marton, J., Hauser, A., Berthele, A., Schwaiger, M., et al. (2005b). Syntheses, biological evaluation, and molecular modeling of 18F-labeled 4-anilidopiperidines as mu-opioid receptor imaging agents. *J. Med. Chem.* 48, 7720–7732. doi: 10.1021/jm0507274

Hermann, D., Hirth, N., Reimold, M., Batra, A., Smolka, M. N., Hoffmann, S., et al. (2017). Low μ-Opioid receptor status in alcohol dependence identified by combined positron emission tomography and post-mortem brain analysis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 606–614. doi: 10.1038/npp.2016.145

Hoffman, B. B., and Lefkowitz, R. J. (1980). Radioligand binding studies of adrenergic receptors: new insights into molecular and physiological regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 581–608. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.003053

Honer, M., Gobbi, L., Martarello, L., and Comley, R. A. (2014). Radioligand development for molecular imaging of the central nervous system with positron emission tomography. *Drug Discov. Today* 19, 1936–1944. doi: 10.1016/j.drudis.2014.08.012

Horti, A. (2007). "[11C]JHU75528, a PET radioligand for imaging of cerebral cannabinoid CB1 receptors," in *Proceedings of the 39-th Meeting of European Brain and Behaviour Society*, Trieste.

Horti, A. G., Fan, H., Kuwabara, H., Hilton, J., Ravert, H. T., Holt, D. P., et al. (2006). 11C-JHU75528: a radiotracer for PET imaging of CB1 cannabinoid receptors. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 47, 1689–1696.

Hsu, D. T., Sanford, B. J., Meyers, K. K., Love, T. M., Hazlett, K. E., Walker, S. J., et al. (2015). It still hurts: altered endogenous opioid activity in the brain during social rejection and acceptance in major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 20, 193–200. doi: 10.1038/mp.2014.185

Hsu, D. T., Sanford, B. J., Meyers, K. K., Love, T. M., Hazlett, K. E., Wang, H., et al. (2013). Response of the μ-opioid system to social rejection and acceptance. *Mol. Psychiatry* 18, 1211–1217. doi: 10.1038/mp.2013.96

Hwang, D., Huang, Y., Ngo, K., Savenkova, L., Guo, N., Zhu, Z., et al. (2001). Preparation and evaluation of [11C]labeled 5-HT1A agonist: (R)-10-Methyl-11-hydroxyaporphine. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 44, 176–178. doi: 10.1002/jlcr.2580440161

Hwang, D., Narendran, R., Hwang, Y., Slifstein, M., Talbot, P., Sudo, Y., et al. (2004). Quantitative analysis of ()-N-11C-Propyl-Norapomorphine *in vivo* binding in nonhumanprimates. *J. Nucl. Med.* 45, 338–346.

Hwang, D., Narendran, R., and Laruelle, M. (2005). Positron-labeled dopamine agonists for probing the high affinity states of dopamine subtype 2 receptors. *Bioconjugate Chem.* 16, 27–31. doi: 10.1021/bc049834n

Hwang, D. R., Kegeles, L. S., and Laruelle, M. (2000). (-)-N-[(11)C]propyl-norapomorphine: a positron-labeled dopamine agonist for PET imaging of D(2) receptors. *Nucl. Med. Biol.* 27, 533–539. doi: 10.1016/s0969-8051(00)00144-x

Ingman, K., Hagelberg, N., Aalto, S., Någren, K., Juhakoski, A., Karhuvaara, S., et al. (2005). Prolonged central mu-opioid receptor occupancy after single and repeated nalmefene dosing. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30, 2245–2253. doi: 10.1038/sj.npp.1300790

Ishikawa, M., Ishiwata, K., Ishii, K., Kimura, Y., Sakata, M., Naganawa, M., et al. (2007). High occupancy of sigma-1 receptors in the human brain after single oral administration of fluvoxamine: a positron emission tomography study using [11C]SA4503. *Biol. Psychiatry* 62, 878–883. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.04.001

Ishikawa, M., Sakata, M., Ishii, K., Kimura, Y., Oda, K., Toyohara, J., et al. (2009). High occupancy of σ1 receptors in the human brain after single oral administration of donepezil: a positron emission tomography study using

[11C]SA4503. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12, 1127–1131. doi: 10.1017/s1461145709990204

Ishiwata, K., Kobayashi, T., Kawamura, K., and Matsuno, K. (2003). Age-related changes of the binding of [3H]SA4503 to sigma1 receptors in the rat brain. *Ann. Nucl. Med.* 17, 73–77. doi: 10.1007/bf02988264

Ishiwata, K., Oda, K., Sakata, M., Kimura, Y., Kawamura, K., Oda, K., et al. (2006). A feasibility study of [11C]SA4503-PET for evaluating sigma1 receptor occupancy by neuroleptics: the binding of haloperidol to sigma1 and dopamine D2-like receptors. *Ann. Nucl. Med.* 20, 569–573. doi: 10.1007/bf03026824

Ishiwata, K., Tsukada, H., Kawamura, K., Kimura, Y., Nishiyama, S., Kobayashi, T., et al. (2001). Mapping of CNS sigma1 receptors in the conscious monkey: preliminary PET study with [11C]SA4503. *Synapse* 40, 235–237. doi: 10.1002/syn.1046

Jagoda, E., Kiesewetter, D., Shimoji, K., Ravasi, L., Yamada, M., Gomeza, J., et al. (2003). Regional brain uptake of the muscarinic ligand, [18F] FP-TZTP, is greatly decreased in M2 receptor knockout mice but not in M1, M3 and M4 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 44, 653–661. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00050-9

Jastrzebska, B., Debinski, A., Filipek, S., and Palczewski, K. (2011). Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: rhodopsin stability and function. *Prog. Lipid Res.* 50, 267–277. doi: 10.1016/j.plipres.2011.03.002

Jin, L. Q., Wang, H. Y., and Friedman, E. (2001). Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions. *J. Neurochem.* 78, 981–990. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00470.x

Jitsuoka, M., Tsukahara, D., Ito, S., Tanaka, T., Takenaga, N., Tokita, S., et al. (2008). Synthesis and evaluation of a spiro-isobenzofuranone class of histamine H3 receptor inverse agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5101–5106. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.07.125

Johansen, A., Hansen, H. D., Svarer, C., Lehel, S., Leth-Petersen, S., Kristensen, J. L., et al. (2018). The importance of small polar radiometabolites in molecular neuroimaging: a PET study with [11C]Cimbi-36 labeled in two positions. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 38, 659–668. doi: 10.1177/0271678X17746179

Jones, J. H., Anderson, P. S., Baldwin, J. J., Clineschmidt, B. V., McClure, D. E., Lundell, G. F., et al. (1984). Synthesis of 4-substituted 2H-naphth[1,2-b]-1,4-oxazines, a new class of dopamine agonists. *J. Med. Chem.* 27, 1607–1613. doi: 10.1021/jm00378a014

Jorgensen, L. M., Weikop, P., Villadsen, J., Visnapuu, T., Ettrup, A., Hansen, H. D., et al. (2017). Cerebral 5-HT release correlates with [11 C]Cimbi36 PET measures of 5-HT2A receptor occupancy in the pig brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 425–434. doi: 10.1177/0271678X16629483

Joutsa, J., Karlsson, H. K., Majuri, J., Nuutila, P., Helin, S., Kaasinen, V., et al. (2018). Binge eating disorder and morbid obesity are associated with lowered mu-opioid receptor availability in the brain. *Psychiatry Res. Neuroimaging* 276, 41–45. doi: 10.1016/j.pscychresns.2018.03.006

Karjalainen, T., Karlsson, H. K., Lahnakoski, J. M., Glerean, E., Nuutila, P., Jääskeläinen, I. P., et al. (2017). Dissociable roles of cerebral μ-Opioid and type 2 dopamine receptors in vicarious pain: a combined PET-fMRI study. *Cereb. Cortex* 27, 4257–4266. doi: 10.1093/cercor/bhx129

Karjalainen, T., Tuominen, L., Manninen, S., Kalliokoski, K. K., Nuutila, P., Jääskeläinen, I. P., et al. (2016). Behavioural activation system sensitivity is associated with cerebral μ-opioid receptor availability. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 11, 1310–1316. doi: 10.1093/scan/nsw044

Karlsson, H. K., Tuominen, L., Tuulari, J. J., Hirvonen, J., Parkkola, R., Helin, S., et al. (2015). Obesity is associated with decreased μ-opioid but unaltered dopamine D2 receptor availability in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3959–3965. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4744-14.2015

Karlsson, H. K., Tuulari, J. J., Tuominen, L., Hirvonen, J., Honka, H., Parkkola, R., et al. (2016). Bariatric surgery normalizes brain opioid receptors. *Mol. Psychiatry* 21:989. doi: 10.1038/mp.2016.116

Kawamura, K., Elsinga, P., Kobayashi, T., Ishii, S., Wang, W., Matsuno, K., et al. (2003a). Synthesis and evaluation of 11C- and 18F-labeled 1-[2-(4-alkoxy-3-methoxyphenyl)ethyl]4-(3-phenylpropyl)piperazines as sigma receptor ligands for positron emission tomography studies. *Nucl. Med. Biol.* 30, 273–284. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00439-0

Kawamura, K., Kimura, Y., Tsukada, H., Kobayashi, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., et al. (2003b). An increase of sigma1 receptors in the aged monkey brain. *Neurobiol. Aging* 24, 745–752. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00152-5

Kawamura, K., Ishiwata, K., Tajima, H., Ishii, S., Matsuno, K., Homma, Y., et al. (2000). *In vivo* evaluation of [11C]SA4503 as a PET ligand for mapping CNS sigma1 receptors. *Nucl. Med. Biol.* 27, 255–261. doi: 10.1016/s0969-8051(00)00081-0

Kawamura, K., Ishiwata, K., Tajima, H., Ishii, S., Shimada, Y., Matsuno, K., et al. (1999). Synthesis and *in vivo* evaluation of [11C]SA6298 as a PET sigma1 receptor ligand. *Nucl. Med. Biol.* 26, 915–922. doi: 10.1016/s0969-8051(99)00069-4

Kawamura, K., Tsukada, H., Shiba, K., Tsuji, C., Harada, N., Kimura, Y., et al. (2007). Synthesis and evaluation of fluorine-18-labeled SA4503 as a selective sigma$_1$ receptor ligand for positron emission tomography. *Nuclear Med. Biol.* 34, 571–577. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.03.009

Keith, D. E., Anton, B., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., et al. (1998). mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism *in vitro* and in the mammalian brain. *Mol. Pharmacol.* 53, 377–384. doi: 10.1124/mol.53.3.377

Kenakin, T. (2015). New lives for seven transmembrane receptors as drug targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 705–706. doi: 10.1016/j.tips.2015.09.004

Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2012). Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 205–216. doi: 10.1038/nrd3954

Kennedy, S. E., Koeppe, R. A., Young, E. A., and Zubieta, J.-K. (2006). Dysregulation of endogenous opioid emotion regulation circuitry in major depression in women. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 1199–1208. doi: 10.1001/archpsyc.63.11.1199

Kent, R. S., De Lean, A., and Lefkowitz, R. J. (1980). A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol. Pharmacol.* 17, 14–23.

Kiesewetter, D., Carson, R., Jagoda, E., Herscovitch, P., and Eckelman, W. (1999). *In vivo* muscarinic binding of 3-(alkylthio)-3-thiadiazolyl tetrahydropyridines. *Synapse* 31, 29–40.

Kiesewetter, D., Lee, J., Lang, L., Park, S., Paik, C., and Eckelman, W. (1995). Preparation of 18F-Labeled muscarinic agonist with M2 selectivity. *J. Med. Chem.* 38, 5–8. doi: 10.1021/jm00001a002

Kiesewetter, D., Vuong, B., and Channing, M. (2003). The automated radiosynthesis of [18F] FP-TZTP. *Nucl. Med. Biol.* 30, 73–77. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00354-2

Kodaka, F., Ito, H., Kimura, Y., Fujie, S., Takano, H., Fujiwara, H., et al. (2012). Test-retest reproducibility of dopamine D2/3 receptor binding in human brain measured by PET with [11C]MNPA and [11C]raclopride. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40, 574–579. doi: 10.1007/s00259-012-2312-8

Kodaka, F., Ito, H., Takano, H., Takahashi, H., Arakawa, R., Miyoshi, M., et al. (2010). Effect of risperidone on high-affinity state of dopamine D2 receptors: a PET study with agonist ligand [11C](R)-2-CH3O-N-n-propylnorapomorphine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 83–89. doi: 10.1017/s1461145710001148

Kubota, M., Nagashima, T., Takano, H., Kodaka, F., Fujiwara, H., Takahata, K., et al. (2017). Affinity states of striatal dopamine D2 receptors in antipsychotic-free patients with schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20, 928–935. doi: 10.1093/ijnp/pyx063

Kumar, J. S. D., Majo, V. J., Hsiung, S.-C., Millak, M. S., Liu, K.-P., Tamir, H., et al. (2006). Synthesis and *in Vivo* Validation of [*O* -Methyl- 11 C]2-{4-[4-(7-methoxynaphthalen-1-yl)piperazin- 1-yl]butyl}-4-methyl-2 *H* -[1,2,4]triazine-3,5-dione: A Novel 5-HT 1A receptor agonist positron emission tomography ligand. *J. Med. Chem.* 49, 125–134. doi: 10.1021/jm050725j

Kumar, J. S. D., Milak, M. S., Majo, V. J., Prabhakaran, J., Mali, P., Savenkova, L., et al. (2012). Comparison of high and low affinity serotonin 1A receptors by PET *in vivo* in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Sci.* 120, 254–257. doi: 10.1254/jphs.12100SC

Kuwabara, H., Heishman, S. J., Brasic, J. R., Contoreggi, C., Cascella, N., Mackowick, K. M., et al. (2014). Mu opioid receptor binding correlates with nicotine dependence and reward in smokers. *PLoS One* 9:e113694. doi: 10.1371/journal.pone.0113694

la Cour, C. M. (2006). Regional differences in the coupling of 5-Hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol. Pharmacol.* 70, 1013–1021. doi: 10.1124/mol.106.022756

Laruelle, M. (2000). Imaging synaptic neurotransmission with *in vivo* binding competition techniques: a critical review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 423–451. doi: 10.1097/00004647-200003000-00001

Laugwitz, K. I., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Van Sande, J., Dumont, J. E., et al. (1996). The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 116–120. doi: 10.1073/pnas.93.1.116

Law, P. Y., Hom, D. S., and Loh, H. H. (1985). Multiple affinity states of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. Opiate agonist association rate is a function of receptor occupancy. *J. Biol. Chem.* 260, 3561–3569.

Laymon, C., Mason, N., Frankle, W., Carney, J., Lopresti, B., Litschge, M., et al. (2009). Human biodistribution and dosimetry of the D2/3 agonist 11C-N-Propylnorapomorphine (11C-NPA) determined from PET. *J. Nucl. Med.* 50, 814–817. doi: 10.2967/jnumed.108.058131

Le Foll, B., Guranda, M., Wilson, A., Houle, S., Rusjan, P., Wing, V., et al. (2013). Elevation of dopamine induced by cigarette smoking: novel insights from a [11C](+)-PHNO PET study in humans. *Neuropsychopharmacology* 39, 415–424. doi: 10.1038/npp.2013.209

Leff, S. E., Hamblin, M. W., and Creese, I. (1985). Interactions of dopamine agonists with brain D1 receptors labeled by 3H-antagonists. Evidence for the presence of high and low affinity agonist-binding states. *Mol. Pharmacol.* 27, 171–183.

Lemoine, L., Becker, G., Vacher, B., Billard, T., Lancelot, S., Newman-Tancredi, A., et al. (2012). Radiosynthesis and preclinical evaluation of 18F-F13714 as a fluorinated 5-HT1A receptor agonist radioligand for PET neuroimaging. *J. Nucl. Med.* 53, 969–976. doi: 10.2967/jnumed.111.101212

Lemoine, L., Verdurand, M., Vacher, B., Blanc, E., Le Bars, D., Newman-Tancredi, A., et al. (2010). [18F]F15599, a novel 5-HT1A receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 594–605. doi: 10.1007/s00259-009-1274-y

Liberzon, I., Taylor, S. F., Phan, K. L., Britton, J. C., Fig, L. M., Bueller, J. A., et al. (2007). Altered central micro-opioid receptor binding after psychological trauma. *Biol. Psychiatry* 61, 1030–1038. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.06.021

Light, S. N., Bieliauskas, L. A., and Zubieta, J.-K. (2017). Top-Down" mu-opioid system function in humans: mu-opioid receptors in ventrolateral prefrontal cortex mediate the relationship between hedonic tone and executive function in major depressive disorder. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 29, 357–364. doi: 10.1176/appi.neuropsych.16090171

Logan, J., Fowler, J., Volkow, N., Wolf, A., Dewey, S., Schlyer, D., 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. doi: 10.1038/jcbfm.1990.127

Luttrell, L. M., Maudsley, S., and Bohn, L. M. (2015). Fulfilling the promise of "Biased" G protein-coupled receptor agonism. *Mol. Pharmacol.* 88, 579–588. doi: 10.1124/mol.115.099630

Ma, Y., Kiesewetter, D., Lang, L., and Eckelman, W. C. (2003). Application of LC-MS to the analysis of new radiopharmaceuticals. *Mol. Imaging Biol. Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 5, 397–403. doi: 10.1016/j.mibio.2003.09.013

Ma, Y., Kiesewetter, D. O., Jagoda, E. M., Huang, B. X., and Eckelman, W. C. (2002). Identification of metabolites of fluorine-18-labeled M2 muscarinic receptor agonist, 3-(3-[(3-fluoropropyl)thio]-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-methylpyridine, produced by human and rat hepatocytes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 766, 319–329. doi: 10.1016/s0378-4347(01)00517-5

Madar, I., Lesser, R. P., Krauss, G., Zubieta, J. K., Lever, J. R., Kinter, C. M., et al. (1997). Imaging of?- and?-opioid receptors in temporal lobe epilepsy by positron emission tomography. *Ann. Neurol.* 41, 358–367. doi: 10.1002/ana.410410311

Majuri, J., Joutsa, J., Johansson, J., Voon, V., Alakurtti, K., Parkkola, R., et al. (2017). Dopamine and opioid neurotransmission in behavioral addictions: a comparative PET study in pathological gambling and binge eating. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1169–1177. doi: 10.1038/npp.2016.265

Manninen, S., Tuominen, L., Dunbar, R. I., Karjalainen, T., Hirvonen, J., Arponen, E., et al. (2017). Social laughter triggers endogenous opioid release in humans. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 6125–6131. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0688-16.2017

Martikainen, I. K., Peciña, M., Love, T. M., Nuechterlein, E. B., Cummiford, C. M., Green, C. R., et al. (2013). Alterations in endogenous opioid functional measures in chronic back pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 14729–14737. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1400-13.2013

Mathis, C. A., Huang, Y., and Simpson, N. R. (1997). Synthesis and evaluation of 5-HT1A agonists a radioligands: failure of G protein-coupled receptor agonists as *in vivo* imaging agents. *J. Label Compd. Radiopharm.* 40, 563–564.

Matuskey, D., Gaiser, E., Gallezot, J., Angarita, G., Pittman, B., Nabulsi, N., et al. (2015). A preliminary study of dopamine D2/3 receptor availability and social status in healthy and cocaine dependent humans imaged with [11C](+)PHNO. *Drug Alcohol Depend.* 154, 167–173. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.06.039

Mayberg, H., Sadzot, B., Meltzer, C., Fisher, R., Lesser, R., Dannals, R., et al. (1991). Quantification of mu and non-mu opiate receptors in temporal lobe epilepsy using positron emission tomography. *Ann. Neurol.* 30, 3–11. doi: 10.1002/ana.410300103

McCormick, P., Ginovart, N., and Wilson, A. (2010). Isoflurane anaesthesia differentially affects the amphetamine sensitivity of agonist and antagonist D2/D3 positron emission tomography radiotracers: implications for *in vivo* imaging of dopamine release. *Mol. Imaging Biol.* 13, 737–746. doi: 10.1007/s11307-010-0380-3

McCormick, P. N., Kapur, S., Reckless, G., and Wilson, A. A. (2009). *Ex vivo* [11C]-(+)-PHNO binding is unchanged in animal models displaying increased high-affinity states of the D 2 receptor *in vitro*. *Synapse* 63, 998–1009. doi: 10.1002/syn.20671

McCormick, P. N., Kapur, S., Seeman, P., and Wilson, A. A. (2008). Dopamine D2 receptor radiotracers [11C](+)-PHNO and [3H]raclopride are indistinguishably inhibited by D2 agonists and antagonists *ex vivo*. *Nucl. Med. Biol.* 35, 11–17. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.08.005

Mick, I., Myers, J., Ramos, A. C., Stokes, P. R. A., Erritzoe, D., Colasanti, A., et al. (2016). Blunted endogenous opioid release following an oral amphetamine challenge in pathological gamblers. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 1742–1750. doi: 10.1038/npp.2015.340

Miederer, I., Buchholz, H.-G., Kronfeld, A., Maus, S., Weyer-Elberich, V., Mildenberger, P., et al. (2018). Pharmacokinetics of the cannabinoid receptor ligand [18 F]MK-9470 in the rat brain - Evaluation of models using microPET. *Med. Phys.* 45, 725–734. doi: 10.1002/mp.12732

Milak, M. S., Severance, A. J., Prabhakaran, J., Kumar, J. D., Majo, V. J., Ogden, R. T., et al. (2011). *In vivo* serotonin-sensitive binding of [11 C]CUMI-101: a serotonin 1A receptor agonist positron emission tomography radiotracer. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 243–249. doi: 10.1038/jcbfm.2010.83

Miller, J. M., Zanderigo, F., Purushothaman, P. D., DeLorenzo, C., Rubin-Falcone, H., Ogden, R. T., et al. (2018). Kappa opioid receptor binding in major depression: a pilot study. *Synapse* 72:e22042. doi: 10.1002/syn.22042

Minkowski, C. P., Epstein, D., Frost, J. J., and Gorelick, D. A. (2012). Differential response to IV carfentanil in chronic cocaine users and healthy controls. *Addict. Biol.* 17, 149–155. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00256.x

Minuzzi, L., and Cumming, P. (2010). Agonist binding fraction of dopamine D2/3 receptors in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Neurochem. Int.* 56, 747–752. doi: 10.1016/j.neuint.2010.01.010

Mishina, M., Ishiwata, K., Ishii, K., Kitamura, S., Kimura, Y., Kawamura, K., et al. (2005). Function of sigma1 receptors in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 112, 103–107. doi: 10.1111/j.1600-0404.2005.00432.x

Mishina, M., Ohyama, M., Ishii, K., Kitamura, S., Kimura, Y., Oda, K., et al. (2008). Low density of sigma1 receptors in early Alzheimer's disease. *Ann. Nucl. Med.* 22, 151–156. doi: 10.1007/s12149-007-0094-z

Mitchell, J. M., O'Neil, J. P., Jagust, W. J., and Fields, H. L. (2013). Catechol-O-methyltransferase genotype modulates opioid release in decision circuitry. *Clin. Transl. Sci.* 6, 400–403. doi: 10.1111/cts.12075

Mitchell, J. M., O'Neil, J. P., Janabi, M., Marks, S. M., Jagust, W. J., and Fields, H. L. (2012). Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Sci. Transl. Med.* 4:116ra6. doi: 10.1126/scitranslmed.3002902

Mizrahi, R., Agid, O., Borlido, C., Suridjan, I., Rusjan, P., Houle, S., et al. (2011). Effects of antipsychotics on D3 receptors: a clinical PET study in

first episode antipsychotic naive patients with schizophrenia using [11C]-(+)-PHNO. *Schizophr. Res.* 131, 63–68. doi: 10.1016/j.schres.2011.05.005

Mizrahi, R., Suridjan, I., Kenk, M., George, T., Wilson, A., Houle, S., et al. (2012). Dopamine response to psychosocial stress in chronic cannabis users: a PET study with 11C-PHNO. *Neuropsychopharmacology* 38, 673–682. doi: 10.1038/npp.2012.232

Mongeau, R., Welner, S. A., Quirion, R., and Suranyi-Cadotte, B. E. (1992). Further evidence for differential affinity states of the serotonin1A receptor in rat hippocampus. *Brain Res.* 590, 229–238. doi: 10.1016/0006-8993(92)91100-s

Naganawa, M., Jacobsen, L. K., Zheng, M.-Q., Lin, S.-F., Banerjee, A., Byon, W., et al. (2014). Evaluation of the agonist PET radioligand [11C]GR103545 to image kappa opioid receptor in humans: kinetic model selection, test–retest reproducibility and receptor occupancy by the antagonist PF-04455242. *Neuroimage* 99, 69–79. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.05.033

Narendran, R. (2005). Measurement of the proportion of D2 receptors configured in state of high affinity for agonists *in vivo*: a positron emission tomography study using [11C]N-Propyl-norapomorphine and [11C]Raclopride in Baboons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 80–90. doi: 10.1124/jpet.105.090068

Narendran, R., Frankle, W., Mason, N., Laymon, C., Lopresti, B., Price, J., et al. (2009). Positron emission tomography imaging of D 2/3 agonist binding in healthy human subjects with the radiotracer. *Synapse* 63, 574–584. doi: 10.1002/syn.20633

Narendran, R., Hwang, D., Slifstein, M., Talbot, P., Erritzoe, D., Huang, Y., et al. (2004). *In vivo* vulnerability to competition by endogenous dopamine: comparison of the D2 receptor agonist radiotracer (-)-N-[11C]propyl-norapomorphine ([11C]NPA) with the D2 receptor antagonist radiotracer [11C]raclopride. *Synapse* 52, 188–208. doi: 10.1002/syn.20013

Narendran, R., Martinez, D., Mason, N. S., Lopresti, B. J., Himes, M. L., Chen, C.-M., et al. (2011). Imaging of dopamine D2/3 agonist binding in cocaine dependence: a [11C]NPA positron emission tomography study. *Synapse* 65, 1344–1349. doi: 10.1002/syn.20970

Narendran, R., Mason, N., Laymon, C., Lopresti, B., Velasquez, N., May, M., et al. (2010). A comparative evaluation of the dopamine D2/3 agonist radiotracer [11C](-)-N-Propyl-norapomorphine and Antagonist [11C]Raclopride to measure amphetamine-induced dopamine release in the human striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 533–539. doi: 10.1124/jpet.109.163501

Narendran, R., Slifstein, M., Hwang, D., Hwang, Y., Scher, E., Reeder, S., et al. (2006). Amphetamine-induced dopamine release: duration of action as assessed with the D2/3 receptor agonist radiotracer (—-)-N-[11C]propyl-norapomorphine ([11C]NPA) in an anesthetized nonhuman primate. *Synapse* 61, 106–109. doi: 10.1002/syn.20346

Neumeyer, J., Neustadt, B., Oh, K., Weinhardt, K., Boyce, C., Rosenberg, F., et al. (1973). Aporphines. 8. total synthesis and pharmacological evaluation of (±)-Apomorphine, (±)-Apocodeine, (±)-N-n-Propylnorapomorphine, and (±)-N-n–Propylnorapocodeine. *J. Med. Chem.* 16, 1223–1228. doi: 10.1021/jm00269a601

Newman-Tancredi, A. (2011). Biased agonism at serotonin 5-HT 1A receptors: preferential postsynaptic activity for improved therapy of CNS disorders. *Neuropsychiatry* 1, 149–164. doi: 10.2217/npy.11.12

Normandin, M., Zheng, M., Lin, K., Mason, N., Lin, S., Ropchan, J., et al. (2015). Imaging the cannabinoid CB1 receptor in humans with. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1313–1322. doi: 10.1038/jcbfm.2015.46

Normandin, M. D., Schiffer, W. K., and Morris, E. D. (2012). A linear model for estimation of neurotransmitter response profiles from dynamic PET data. *Neuroimage* 59, 2689–2699. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.07.002

Nuechterlein, E. B., Ni, L., Domino, E. F., and Zubieta, J.-K. (2016). Nicotine-specific and non-specific effects of cigarette smoking on endogenous opioid mechanisms. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 69, 69–77. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.04.006

Nummenmaa, L., Manninen, S., Tuominen, L., Hirvonen, J., Kalliokoski, K. K., Nuutila, P., et al. (2015). Adult attachment style is associated with cerebral μ-opioid receptor availability in humans. *Hum. Brain Mapp.* 36, 3621–3628. doi: 10.1002/hbm.22866

Nummenmaa, L., Saanijoki, T., Tuominen, L., Hirvonen, J., Tuulari, J. J., Nuutila, P., et al. (2018). μ-opioid receptor system mediates reward processing in humans. *Nat. Commun.* 9:1500. doi: 10.1038/s41467-018-03848-y

Offermanns, S., Wieland, T., Homann, D., Sandmann, J., Bombien, E., Spicher, K., et al. (1994). Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol. Pharmacol.* 45, 890–898.

Olli-Lähdesmäki, T., Kallio, J., and Scheinin, M. (1999). Receptor subtype-induced targeting and subtype-specific internalization of human α 2 -Adrenoceptors in PC12 cells. *J. Neurosci.* 19, 9281–9288. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-21-09281.1999

Ooms, M., Rietjens, R., Rangarajan, J. R., Vunckx, K., Valdeolivas, S., Maes, F., et al. (2014). Early decrease of type 1 cannabinoid receptor binding and phosphodiesterase 10A activity *in vivo* in R6/2 Huntington mice. *Neurobiol. Aging* 35, 2858–2869. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.010

Otsuka, T., Ito, H., Halldin, C., Takahashi, H., Takano, H., Arakawa, R., et al. (2009). Quantitative PET analysis of the dopamine D2 receptor agonist radioligand 11C-(R)-2-CH3O-N-n-Propylnorapomorphine in the human brain. *J. Nucl. Med.* 50, 703–710. doi: 10.2967/jnumed.108.058503

Palner, M., Kjaerby, C., Knudsen, G., and Cumming, P. (2011). Effects of unilateral 6-OHDA lesions on [3H]N-propylnorapomorphine binding in striatum *ex vivo* and vulnerability to amphetamine-evoked dopamine release in rat. *Neurochem. Int.* 58, 243–247. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.007

Paterson, L. M., Tyacke, R. J., Nutt, D. J., and Knudsen, G. M. (2010). Measuring endogenous 5-HT release by emission tomography: promises and pitfalls. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 1682–1706. doi: 10.1038/jcbfm.2010.104

Peciña, M., Bohnert, A. S. B., Sikora, M., Avery, E. T., Langenecker, S. A., Mickey, B. J., et al. (2015a). Association between placebo-activated neural systems and antidepressant responses: neurochemistry of placebo effects in major depression. *JAMA Psychiatry* 72:1087. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.1335

Peciña, M., Love, T., Stohler, C. S., Goldman, D., and Zubieta, J.-K. (2015b). Effects of the Mu opioid receptor polymorphism (OPRM1 A118G) on pain regulation, placebo effects and associated personality trait measures. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 40, 957–965. doi: 10.1038/npp.2014.272

Pejchal, T., Foley, M. A., Kosofsky, B. E., and Waeber, C. (2002). Chronic fluoxetine treatment selectively uncouples raphe 5-HT 1A receptors as measured by [35 S]-GTP γ S autoradiography. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1115–1122. doi: 10.1038/sj.bjp.0704555

Peng, T., Zysk, J., Dorff, P., Elmore, C. S., Ström, P., Malmquist, J., et al. (2010). D2 receptor occupancy in conscious rat brain is not significantly distinguished with [3H]-MNPA, [3H]-(+)-PHNO, and [3H]-raclopride. *Synapse* 64, 624–633. doi: 10.1002/syn.20771

Pike, V. W. (2009). PET radiotracers: crossing the blood–brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 431–440. doi: 10.1016/j.tips.2009.05.005

Placzek, M. S., Schroeder, F. A., Che, T., Wey, H.-Y., Neelamegam, R., Wang, C., et al. (2018). Discrepancies in kappa opioid agonist binding revealed through PET imaging. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 384–395. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00293

Placzek, M. S., Van de Bittner, G. C., Wey, H.-Y., Lukas, S. E., and Hooker, J. M. (2015). Immediate and persistent effects of salvinorin A on the kappa opioid receptor in rodents, monitored *in vivo* with PET. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 40, 2865–2872. doi: 10.1038/npp.2015.159

Podruchny, T. A., Connolly, C., Bokde, A., Herscovitch, P., Eckelman, W. C., Kiesewetter, D. O., et al. (2003). *In vivo* muscarinic 2 receptor imaging in cognitively normal young and older volunteers. *Synapse* 48, 39–44. doi: 10.1002/syn.10165

Prante, O., Tietze, R., Hocke, C., Löber, S., Hübner, H., Kuwert, T., et al. (2008). Synthesis, radiofluorination, and *in vitro* evaluation of pyrazolo[1,5-a]pyridine-based dopamine D4 receptor ligands: discovery of an inverse agonist radioligand for PET. *J. Med. Chem.* 51, 1800–1810. doi: 10.1021/jm701375u

Prossin, A. R., Koch, A. E., Campbell, P. L., McInnis, M. G., Zalcman, S. S., and Zubieta, J.-K. (2011). Association of plasma interleukin-18 levels with emotion regulation and μ-opioid neurotransmitter function in major depression and healthy volunteers. *Biol. Psychiatry* 69, 808–812. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.10.014

Pucadyil, T. J., and Chattopadhyay, A. (2007). The human serotonin1A receptor exhibits G-protein-dependent cell surface dynamics. *Glycoconj. J.* 24, 25–31. doi: 10.1007/s10719-006-9008-x

Quelch, D., De Santis, V., Strege, A., Myers, J., Wells, L., Nutt, D., et al. (2014). Influence of agonist induced internalization on [3H]Ro15-4513 binding-an application to imaging fluctuations in endogenous GABA with positron emission tomography. *Synapse* 69, 60–65. doi: 10.1002/syn.21780

Rabiner, E. A., Beaver, J., Makwana, A., Searle, G., Long, C., Nathan, P. J., et al. (2011). Pharmacological differentiation of opioid receptor antagonists by molecular and functional imaging of target occupancy and food reward-related brain activation in humans. *Mol. Psychiatry* 16:785. doi: 10.1038/mp.2011.29

Ramakrishnan, N., Visser, A., Rybczynska, A., Nyakas, C., Luiten, P., Kwizera, C., et al. (2015). Sigma-1 agonist binding in the aging rat brain: a MicroPET study with [11C]SA4503. *Mol. Imaging Biol.* 18, 588–597. doi: 10.1007/s11307-015-0917-6

Ravasi, L., Tokugawa, J., Nakayama, T., Seidel, J., Sokoloff, L., Eckelman, W., et al. (2012). Imaging of the muscarinic acetylcholine neuroreceptor in rats with the M2 selective agonist [18F] FP-TZTP. *Nucl. Med. Biol.* 39, 45–55. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2011.06.003

Ravert, H., Mathews, W., Musachio, J., Scheffel, U., Finley, P., and Dannals, R. (1999). [11C]methyl 4-[(3,4-dichlorophenyl)acetyl]3-[(1-pyrrolidinyl)methyl]1-piperazinecarboxylate. *Nucl. Med. Biol.* 26, 737–741. doi: 10.1016/s0969-8051(99)00043-8

Ravert, H., Scheffel, U., Mathews, W., Musachio, J., and Dannals, R. (2002). [11C]GR89696, a potent kappa opiate receptor radioligand; *in vivo* binding of the R and S enantiomers. *Nucl. Med. Biol.* 29, 47–53. doi: 10.1016/s0969-8051(01)00285-2

Ray, R., Ruparel, K., Newberg, A., Wileyto, E., Loughead, J., Divgi, C., et al. (2011). Human Mu Opioid Receptor (OPRM1 A118G) polymorphism is associated with brain mu-opioid receptor binding potential in smokers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9268–9273. doi: 10.1073/pnas.1018699108

Rbah, L., Leviel, V., and Zimmer, L. (2003). Displacement of the PET ligand ^{18}F-MPPF by the electrically evoked serotonin release in the rat hippocampus. *Synapse* 49, 239–245. doi: 10.1002/syn.10235

Reboreda, A., Theissen, F. M., Valero-Aracama, M. J., Arboit, A., Corbu, M. A., and Yoshida, M. (2018). Do TRPC channels support working memory? Comparing modulations of TRPC channels and working memory through G-protein coupled receptors and neuromodulators. *Behav. Brain Res.* 354, 64–83. doi: 10.1016/j.bbr.2018.02.042

Riad, M., Watkins, K. C., Doucet, E., Hamon, M., and Descarries, L. (2001). Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J. Neurosci.* 21, 8378–8386. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-21-08378.2001

Richfield, E. K., Young, A. B., and Penney, J. B. (1986). Properties of D2 dopamine receptor autoradiography: high percentage of high-affinity agonist sites and increased nucleotide sensitivity in tissue sections. *Brain Res.* 383, 121–128. doi: 10.1016/0006-8993(86)90013-2

Saanijoki, T., Nummenmaa, L., Tuulari, J. J., Tuominen, L., Arponen, E., Kalliokoski, K. K., et al. (2018). Aerobic exercise modulates anticipatory reward processing via the μ-opioid receptor system. *Hum. Brain Mapp.* 39, 3972–3983. doi: 10.1002/hbm.24224

Sakata, M., Kimura, Y., Naganawa, M., Oda, K., Ishii, K., Chihara, K., et al. (2007). Mapping of human cerebral sigma1 receptors using positron emission tomography and [11C]SA4503. *Neuroimage* 35, 1–8. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.11.055

Sanabria-Bohórquez, S. M., Hamill, T. G., Goffin, K., De Lepeleire, I., Bormans, G., Burns, H. D., et al. (2010). Kinetic analysis of the cannabinoid-1 receptor PET tracer [18F]MK-9470 in human brain. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 920–933. doi: 10.1007/s00259-009-1340-5

Sauerberg, P., Olesen, P., Nielsen, S., Treppendahl, S., Sheardown, M., Honore, T., et al. (1992). Novel functional M1 selective muscarinic agonists. Synthesis and structure-activity relationships of 3-(1,2,5-thiadiazolyl)-1,2,5,6-tetrahydro-1-methylpyridines. *J. Med. Chem.* 35, 2274–2283. doi: 10.1021/jm00090a019

Schaffhausen, J. (2017). What precisely is precision medicine? *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 1–2. doi: 10.1016/j.tips.2016.11.004

Schoultz, B., Hjornevik, T., Willoch, F., Marton, J., Noda, A., Murakami, Y., et al. (2010). Evaluation of the kappa-opioid receptor-selective tracer [11C]GR103545 in awake rhesus macaques. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 1174–1180. doi: 10.1007/s00259-010-1384-6

Schreiber, G., and Avissar, S. (2000). G proteins as a biochemical tool for diagnosis and monitoring treatments of mental disorders. *Isr. Med. Assoc. J.* 2(Suppl.), 86–91.

Schreiber, G., Golan, M., and Avissar, S. (2009). Beta-arrestin signaling complex as a target for antidepressants and as a depression marker. *Drug News Perspect.* 22, 467–480.

Scott, D. J., Domino, E. F., Heitzeg, M. M., Koeppe, R. A., Ni, L., Guthrie, S., et al. (2007a). Smoking modulation of μ-Opioid and dopamine D2 receptor-mediated neurotransmission in humans. *Neuropsychopharmacology* 32, 450–457. doi: 10.1038/sj.npp.1301238

Scott, D. J., Stohler, C. S., Koeppe, R. A., and Zubieta, J.-K. (2007b). Time-course of change in [11C]carfentanil and [11C]raclopride binding potential after a nonpharmacological challenge. *Synapse* 61, 707–714. doi: 10.1002/syn.20404

Scott, D. J., Stohler, C. S., Egnatuk, C. M., Wang, H., Koeppe, R. A., and Zubieta, J.-K. (2008). Placebo and nocebo effects are defined by opposite opioid and dopaminergic responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 220–231. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2007.34

Searle, G., Beaver, J. D., Comley, R. A., Bani, M., Tziortzi, A., Slifstein, M., et al. (2010). Imaging dopamine D3 receptors in the human brain with positron emission tomography, [11C]PHNO, and a selective D3 receptor antagonist. *Biol. Psychiatry* 68, 392–399. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.04.038

Seeman, P. (2009). Dopamine D2 High receptors measured *ex vivo* are elevated in amphetamine-sensitized animals. *Synapse* 63, 186–192. doi: 10.1002/syn.20595

Seeman, P. (2012). Dopamine agonist radioligand binds to both D2High and D2Low receptors, explaining why alterations in D2High are not detected in human brain scans. *Synapse* 66, 88–93. doi: 10.1002/syn.20987

Seeman, P., Hall, F. S., and Uhl, G. (2007). Increased dopamine D2High receptors in knockouts of the dopamine transporter and the vesicular monoamine transporter may contribute to spontaneous hyperactivity and dopamine supersensitivity. *Synapse* 61, 573–576. doi: 10.1002/syn.20402

Seeman, P., and Kapur, S. (2003). Anesthetics inhibit high-affinity states of dopamine D2 and other G-linked receptors. *Synapse* 50, 35–40. doi: 10.1002/syn.10221

Seneca, N., Finnema, S., Farde, L., Gulyás, B., Wikström, H., Halldin, C., et al. (2006). Effect of amphetamine on dopamine D2 receptor binding in nonhuman primate brain: a comparison of the agonist radioligand [11C]MNPA and antagonist [11C]raclopride. *Synapse* 59, 260–269. doi: 10.1002/syn.20238

Seneca, N., Skinbjerg, M., Zoghbi, S. S., Liow, J., Gladding, R. L., Hong, J., et al. (2008a). Kinetic brain analysis and whole-body imaging in monkey of [11C]MNPA: a dopamine agonist radioligand. *Synapse* 62, 700–709. doi: 10.1002/syn.20544

Seneca, N., Zoghbi, S., Skinbjerg, M., Liow, J., Hong, J., Sibley, D., et al. (2008b). Occupancy of dopamine D 2/3 receptors in rat brain by endogenous dopamine measured with the agonist positron. *Emiss. Tomogr. Radioligand* 62, 756–763. doi: 10.1002/syn.20549

Shalgunov, D. (2017). *Development of 18F-Labeled Agonist Radioligands for PET Imaging of the High-Affinity State of Cerebral Dopamine D2/3 Receptors*. Master's thesis, Groningen: University of Groningen.

Shalgunov, V., van Waarde, A., Booij, J., Michel, M. C., Dierckx, R. A. J. O., and Elsinga, P. H. (2019). Hunting for the high-affinity state of G-protein-coupled receptors with agonist tracers: theoretical and practical considerations for positron emission tomography imaging. *Med. Res. Rev.* 39, 1014–1052. doi: 10.1002/med.21552

Shen, C., Li, H., and Meller, E. (2002). Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT1A agonist-stimulated [35S]GTPγS binding in rat brain regions. *Neuropharmacology* 42, 1031–1038. doi: 10.1016/S0028-3908(02)00064-3

Shimoji, K., Esaki, T., Itoh, Y., Ravasi, L., Cook, M., Jehle, J., et al. (2003). Inhibition of [^{18}F] FP-TZTP binding by loading doses of muscarinic agonists P-TZTP or FP-TZTP *in vivo* is not due to agonist-induced reduction in cerebral blood flow. *Synapse* 50, 151–163. doi: 10.1002/syn.10257

Shiue, C.-Y., Bai, L.-Q., Teng, R.-R., Arnett, C. D., Dewey, S. L., Wolf, A. P., et al. (1991). A comparison of the brain uptake of N-(cyclopropyl[^{11}C]methyl) norbuprenorphine ([^{11}C]buprenorphine) and N-(cyclopropyl[^{11}C]methyl) nordiprenorphme ([^{11}C]diprenorphine) in baboon using PET. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B Nuclear Med. Biol.* 18, 281–288. doi: 10.1016/0883-2897(91)90123-3

Shotbolt, P., Tziortzi, A. C., Searle, G. E., Colasanti, A., van der Aart, J., Abanades, S., et al. (2012). Within-subject comparison of [^{11}C]-(+)-PHNO and [^{11}C]raclopride sensitivity to acute amphetamine challenge in healthy humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 127–136. doi: 10.1038/jcbfm.2011.115

Sibley, D. R., De Lean, A., and Creese, I. (1982). Anterior pituitary dopamine receptors. Demonstration of interconvertible high and low affinity states of the D-2 dopamine receptor. *J. Biol. Chem.* 257, 6351–6361.

Skinbjerg, M., Liow, J.-S., Seneca, N., Hong, J., Lu, S., Thorsell, A., et al. (2010). D2 dopamine receptor internalization prolongs the decrease of radioligand binding after amphetamine: a PET study in a receptor internalization-deficient mouse model. *Neuroimage* 50, 1402–1407. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.01.055

Skinbjerg, M., Namkung, Y., Halldin, C., Innis, R. B., and Sibley, D. R. (2009). Pharmacological characterization of 2-methoxy- *N* -propylnorapomorphine's interactions with D 2 and D 3 dopamine receptors. *Synapse* 63, 462–475. doi: 10.1002/syn.20626

Skinbjerg, M., Sibley, D. R., Javitch, J. A., and Abi-Dargham, A. (2012). Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor *in vivo*: fact or fiction? *Biochem. Pharmacol.* 83, 193–198. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.008

Smith, Y. R., Zubieta, J.-K., del Carmen, M. G., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Zacur, H. A., et al. (1998). Brain opioid receptor measurements by positron emission tomography in normal cycling women: relationship to luteinizing hormone pulsatility and gonadal steroid Hormones1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 4498–4505. doi: 10.1210/jcem.83.12.5351

Steiger, C., Finnema, S., Raus, L., Schou, M., Nakao, R., Suzuki, K., et al. (2009). A two-step one-pot radiosynthesis of the potent dopamine D 2 /D 3 agonist. *J. Label Compd. Radiopharm.* 52, 158–165. doi: 10.1002/jlcr.1583

Suehiro, M., Underwood, M., Arango, V., Wang, T., Kassir, S., Bakalian, M., et al. (1998). *In vivo* biodistribution of a radiotracer for imaging serotonin-1a receptor sites with pet: [11C]Ly274601. *Life Sci.* 63, 1533–1542. doi: 10.1016/s0024- 3205(98)00420- 2

Talbot, P. S., Narendran, R., Butelman, E. R., Huang, Y., Ngo, K., Slifstein, M., et al. (2005). 11C-GR103545, a radiotracer for imaging kappa-opioid receptors *in vivo* with PET: synthesis and evaluation in baboons. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 46, 484–494.

Thathiah, A., and De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 73–87. doi: 10.1038/nrn2977

Thomae, D., Morley, T., Hamill, T., Carroll, V., Papin, C., Twardy, N., et al. (2014). Automated one-step radiosynthesis of the CB1receptor imaging agent [18F] MK-9470. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 57, 611–614. doi: 10.1002/jlcr.3219

Thorell, J. O. (1995). (R)-[N-11C-methyl]11-hydroxy-10-methylaporphine as a ligand for 5-HT1A receptors: synthesis and evaluation of its biodistribution in monkey with PET. *J. Label Compd. Radiopharm.* 44:179.

Titeler, M., Lyon, R., Kuhar, M., Frost, J., Dannals, R., Leonhardt, S., et al. (1989). μ Opiate receptors are selectively labelled by [3H]carfentanil in human and rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 167, 221–228. doi: 10.1016/0014-2999(89)90582-7

Tokunaga, M., Seneca, N., Shin, R., Maeda, J., Obayashi, S., Okauchi, T., et al. (2009). Neuroimaging and physiological evidence for involvement of glutamatergic transmission in regulation of the striatal dopaminergic system. *J. Neurosci.* 29, 1887–1896. doi: 10.1523/jneurosci.2559-08.2009

Tomasi, G., Nabulsi, N., Zheng, M., Weinzimmer, D., Ropchan, J., Blumberg, L., et al. (2013). Determination of *in vivo* Bmax and Kd for 11C-GR103545, an agonist PET Tracer for κ-Opioid receptors: a study in nonhuman primates. *J. Nucl. Med.* 54, 600–608. doi: 10.2967/jnumed.112.112672

Tsukada, H., Miyasato, K., Kakiuchi, T., Nishiyama, S., Harada, N., and Domino, E. F. (2002). Comparative effects of methamphetamine and nicotine on the striatal [^{11}C]raclopride binding in unanesthetized monkeys. *Synapse* 45, 207–212. doi: 10.1002/syn.10102

Tsukada, H., Ohba, H., Nishiyama, S., and Kakiuchi, T. (2011). Differential effects of stress on [11C]raclopride and [11C]MNPA binding to striatal D2/D3 dopamine receptors: a PET study in conscious monkeys. *Synapse* 65, 84–89. doi: 10.1002/syn.20845

Tuominen, L., Tuulari, J., Karlsson, H., Hirvonen, J., Helin, S., Salminen, P., et al. (2015). Aberrant mesolimbic dopamine-opiate interaction in obesity. *Neuroimage* 122, 80–86. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.08.001

Tuulari, J. J., Tuominen, L., de Boer, F. E., Hirvonen, J., Helin, S., Nuutila, P., et al. (2017). Feeding releases endogenous opioids in humans. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 8284–8291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0976-17.2017

Udo de Haes, J. I., Harada, N., Elsinga, P. H., Maguire, R. P., and Tsukada, H. (2006). Effect of fenfluramine-induced increases in serotonin release on [18F]MPPF binding: a continuous infusion PET study in conscious monkeys. *Synapse* 59, 18–26. doi: 10.1002/syn.20209

Van de Bittner, G. C., Ricq, E. L., and Hooker, J. M. (2014). A Philosophy for CNS radiotracer design. *Acc. Chem. Res.* 47, 3127–3134. doi: 10.1021/ar500233s

Van der Schueren, B. J., Van Laere, K., Gérard, N., Bormans, G., and De Hoon, J. N. (2012). Interictal type 1 cannabinoid receptor binding is increased in female migraine patients. *Headache J. Head Face Pain* 52, 433–440. doi: 10.1111/j.1526-4610.2011.02030.x

van der Werf, J. F., Sebens, J. B., Vaalburg, W., and Korf, J. (1983). *In vivo* binding of N-n-propylnorapomorphine in the rat brain: regional localization, quantification in striatum and lack of correlation with dopamine metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 87, 259–270. doi: 10.1016/0014-2999(83)90336-9

Van Laere, K., Casteels, C., Lunskens, S., Goffin, K., Grachev, I. D., Bormans, G., et al. (2012). Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease *in vivo*. *Neurobiol. Aging* 33:620.e1-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.009

Van Laere, K., Goffin, K., Bormans, G., Casteels, C., Mortelmans, L., de Hoon, J., et al. (2009). Relationship of Type 1 cannabinoid receptor availability in the human brain to novelty-seeking temperament. *Arch. Gen. Psychiatry* 66:196. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2008.530

Van Laere, K., Goffin, K., Casteels, C., Dupont, P., Mortelmans, L., de Hoon, J., et al. (2008a). Gender-dependent increases with healthy aging of the human cerebral cannabinoid-type 1 receptor binding using [18F]MK-9470 PET. *Neuroimage* 39, 1533–1541. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.10.053

Van Laere, K., Koole, M., Sanabria Bohorquez, S., Goffin, K., Guenther, I., Belanger, M., et al. (2008b). Whole-body biodistribution and radiation dosimetry of the human cannabinoid type-1 receptor ligand 18F-MK-9470 in healthy subjects. *J. Nucl. Med.* 49, 439–445. doi: 10.2967/jnumed.107.047290

Van Laere, K., Sanabria-Bohorquez, S., Mozley, D., Burns, D., Hamill, T., Van Hecken, A., et al. (2013). 11C-MK-8278 PET as a tool for pharmacodynamic brain occupancy of histamine 3 receptor inverse agonists. *J. Nucl. Med.* 55, 65–72. doi: 10.2967/jnumed.113.122515

Van Laere, K. J., Sanabria-Bohorquez, S. M., Mozley, D. P., Burns, D. H., Hamill, T. G., Van Hecken, A., et al. (2014). 11C-MK-8278 PET as a tool for pharmacodynamic brain occupancy of histamine 3 receptor inverse agonists. *J. Nucl. Med.* 55, 65–72. doi: 10.2967/jnumed.113.122515

van Oosten, E. M., Wilson, A. A., Stephenson, K. A., Mamo, D. C., Pollock, B. G., Mulsant, B. H., et al. (2009). An improved radiosynthesis of the muscarinic M2 radiopharmaceutical, [18F]FP-TZTP. *Appl. Radiat. Isot.* 67, 611–616. doi: 10.1016/j.apradiso.2008.12.015

Vandecapelle, M., Dumont, F., De Vos, F., Strijckmans, K., Leysen, D., Audenaert, K., et al. (2004). Synthesis and preliminary*in vivo* evaluation of 4-[18F] fluoro-N-2-[4-(6-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl]ethylbenzamide, a potential PET radioligand for the 5-HT1A receptor. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 47, 531–542. doi: 10.1002/jlcr.837

Vidal, B., Fieux, S., Redouté, J., Villien, M., Bonnefoi, F., Le Bars, D., et al. (2018). *In vivo* biased agonism at 5-HT1A receptors: characterisation by simultaneous PET/MR imaging. *Neuropsychopharmacology* 43, 2310–2319. doi: 10.1038/s41386-018-0145-2

Vidal, B., Sebti, J., Verdurand, M., Fieux, S., Billard, T., Streichenberger, N., et al. (2016). Agonist and antagonist bind differently to 5-HT 1A receptors during Alzheimer's disease: a post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. *Neuropharmacology* 109, 88–95. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.05.009

Wager, T. D., Scott, D. J., and Zubieta, J.-K. (2007). Placebo effects on human mu-opioid activity during pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11056–11061. doi: 10.1073/pnas.0702413104

Wand, G. S., Weerts, E. M., Kuwabara, H., Wong, D. F., Xu, X., and McCaul, M. E. (2012). The relationship between naloxone-induced cortisol and mu opioid receptor availability in mesolimbic structures is disrupted in alcohol dependent subjects. *Alcohol Fayettev. N* 46, 511–517. doi: 10.1016/j.alcohol.2012.04.006

Watson, J., Collin, L., Ho, M., Riley, G., Scott, C., Selkirk, J. V., et al. (2000). 5-HT1A receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of

intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1108–1114. doi: 10.1038/sj.bjp.0703394

Weerts, E. M., Kim, Y. K., Wand, G. S., Dannals, R. F., Lee, J. S., Frost, J. J., et al. (2008). Differences in delta- and mu-opioid receptor blockade measured by positron emission tomography in naltrexone-treated recently abstinent alcohol-dependent subjects. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 653–665. doi: 10.1038/sj.npp.1301440

Weerts, E. M., Wand, G. S., Kuwabara, H., Munro, C. A., Dannals, R. F., Hilton, J., et al. (2011). Positron emission tomography imaging of mu- and delta-opioid receptor binding in alcohol-dependent and healthy control subjects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 2162–2173. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01565.x

Weerts, E. M., Wand, G. S., Kuwabara, H., Xu, X., Frost, J. J., Wong, D. F., et al. (2014). Association of smoking with μ-opioid receptor availability before and during naltrexone blockade in alcohol-dependent subjects. *Addict. Biol.* 19, 733–742. doi: 10.1111/adb.12022

Willeit, M., Ginovart, N., Graff, A., Rusjan, P., Vitcu, I., Houle, S., et al. (2008). First human evidence of d-amphetamine induced displacement of a D2/3 agonist radioligand: a [11C]-(+)-PHNO positron emission tomography study. *Neuropsychopharmacology* 33, 279–289. doi: 10.1038/sj.npp.1301400

Willeit, M., Ginovart, N., Kapur, S., Houle, S., Hussey, D., Seeman, P., et al. (2006). High-Affinity states of human brain dopamine D2/3 receptors imaged by the agonist [11C](+)-PHNO. *Biol. Psychiatry* 59, 389–394. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.017

Wilson, A. A., McCormick, P., Kapur, S., Willeit, M., Garcia, A., Hussey, D., et al. (2005). Radiosynthesis and evaluation of [11 C]-(+)-4-Propyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2 *H* -naphtho[1,2- *b*][1,4]oxazin-9-ol as a potential radiotracer for *in vivo* imaging of the dopamine D2 high-affinity state with positron emission tomography. *J. Med. Chem.* 48, 4153–4160. doi: 10.1021/jm050155n

Wong, D., Kuwabara, H., Horti, A., Raymont, V., Brasic, J., Guevara, M., et al. (2010). Quantification of cerebral cannabinoid receptors subtype 1 (CB1) in healthy subjects and schizophrenia by the novel PET radioligand [11C]OMAR. *Neuroimage* 52, 1505–1513. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.04.034

Wong, D. F., Kuwabara, H., Horti, A. G., Kumar, A., Brasic, J., Ye, W., et al. (2008). "Imaging of Human Cannaboid CB1 Type Human Receptors with [11C]OMAR," in *Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine*, New Orleans, LA.

Yang, K.-C., Stepanov, V., Martinsson, S., Ettrup, A., Takano, A., Knudsen, G. M., et al. (2017). Fenfluramine reduces [11C]Cimbi-36 binding to the 5-HT2A receptor in the nonhuman primate brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20, 683–691. doi: 10.1093/ijnp/pyx051

Yokoyama, C., Mawatari, A., Kawasaki, A., Takeda, C., Onoe, K., Doi, H., et al. (2016). Marmoset serotonin 5-HT 1A receptor mapping with a biased agonist PET probe 18 F-F13714: comparison with an antagonist tracer 18 F-MPPF in awake and anesthetized states. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19:yw079. doi: 10.1093/ijnp/pyw079

Zijlstra, S., van der Worp, H., Wiegman, T., Visser, G. M., Korf, J., and Vaalburg, W. (1993). Synthesis and *in vivo* distribution in the rat of a dopamine agonist: N-([11C]methyl)norapomorphine. *Nucl. Med. Biol.* 20, 7–12. doi: 10.1016/0969-8051(93)90131-d

Zimmer, L. (2016). Pharmacological agonists for more-targeted CNS radiopharmaceuticals. *Oncotarget* 7, 80111–80112. doi: 10.18632/oncotarget.13418

Zimmer, L., Fournet, G., Benoît, J., Guillaumet, G., and Le Bars, D. (2003). Carbon-11 labelling of 8[[3-[4-(2-[(11)C]methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-2-hydroxypropyl]oxy]thiochroman, a presynaptic 5-HT(1A) receptor agonist, and its *in vivo* evaluation in anaesthetised rat and in awake cat. *Nucl. Med. Biol.* 30, 541–546. doi: 10.1016/s0969-8051(03)00027-1

Zimmer, L., Mauger, G., Le Bars, D., Bonmarchand, G., Luxen, A., and Pujol, J.-F. (2002). Effect of endogenous serotonin on the binding of the 5-HT_{1A} PET ligand ^{18}F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic beta measurements combined with microdialysis. *J. Neurochem.* 80, 278–286. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00696.x

Zimmer, L., Riad, M., Rbah, L., Belkacem-Kahlouli, A., Le Bars, D., Renaud, B., et al. (2004). Toward brain imaging of serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor internalization. *Neuroimage* 22, 1421–1426. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.03.020

Zubieta, J., Dannals, R., and Frost, J. (1999). Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. *Am. J. Psychiatry* 156, 842–848. doi: 10.1176/ajp.156.6.842

Zubieta, J., Gorelick, D., Stauffer, R., Ravert, H., Dannals, R., and Frost, J. (1996). Increased mu opioid receptor binding detected by PET in cocaine–dependent men is associated with cocaine craving. *Nat. Med.* 2, 1225–1229. doi: 10.1038/nm1196-1225

Zubieta, J., Greenwald, M. K., Lombardi, U., Woods, J. H., Kilbourn, M. R., Jewett, D. M., et al. (2000). Buprenorphine-induced changes in mu-opioid receptor availability in male heroin-dependent volunteers: a preliminary study. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 23, 326–334. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00110-X

Zubieta, J.-K., Bueller, J. A., Jackson, L. R., Scott, D. J., Xu, Y., Koeppe, R. A., et al. (2005). Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7754–7762. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0439-05.2005

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Colom, Vidal and Zimmer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

V. Matériel supplémentaire de la revue

Des données complémentaires sont proposées en annexe de la revue éditée. Nous les proposons ici dans leur forme publiée.

The following paragraphs describe the PET agonist radiotracers whose preclinical studies have not yet led to imaging studies in humans.

Dopaminergic receptors

D_1 receptors

[^{11}C]SKF 82957/[^{11}C]SKF 75670

In 1996, DaSilva and colleagues reported the synthesis and *in vitro* autoradiographic evaluation of benzazepine derivatives known for their D_1 agonist properties, radiolabeled with ^{11}C: i.e., the partial agonist [^{11}C]SKF 75670 and its 6-chloro derivative agonist [^{11}C]SKF82957(112). Both compounds showed specific and selective *in vivo* binding in rat striatum, a region rich in D_1 receptors(113). Further *in vivo* studies on R-[^{11}C]SKF82957 demonstrated acceptable radiation dosimetry, no metabolites in rat brain extracts, and a low level of metabolites in rat plasma (114). However, a 2010 study in rats showed that this tracer gave rise to a brain-penetrant radiometabolite; tolcapone pretreatment increased tracer performance in imaging D_1 receptors by inhibiting the production of this interfering metabolite (115).

D_2/D_3 Receptors

[^{11}C]SV-III-130

[^{11}C]-SV-III-130 is a partial agonist of D_2 receptors with high affinity, and a derivative of the atypical antipsychotic aripiprazole (116). Preclinical studies on rhesus monkey demonstrated selective binding to D_2 receptors, unchanged by blocking with a D_3 selective ligand (117). In the same study, [^{11}C]SV-III-30 binding was unchanged by lorazepam pretreatment to reduce endogenous dopamine, but was decreased by administration of d-amphetamine to increase synaptic dopamine levels. Challenge studies using [^{11}C]-SV-III-130 and various data on [^{18}F]-LS-3134, a D_3 radiotracer, showed that D_2 receptors could be quantified without depleting the dopaminergic synapses of endogenous neurotransmitter, whereas that is necessary in order to quantify D_3 receptors.

[^{11}C]5-OH-DPAT/[^{11}C]-PPHT/[^{11}C]-ZYY-339

An American team aimed to develop compounds to image D_2 high-affinity (HA) sites using the tetralin structure. They designed their first potential radiotracers labelled with ^{11}C, [^{11}C]-5-OH-DPAT, [^{11}C]PPHT and [^{11}C]ZYY-339. Incubation with sulpiride showed only a little non-specific binding in cortical areas (118). [^{11}C]-5-OH-DPAT was then further evaluated *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* studies in rats confirmed specific binding on D_2 receptor HA sites using Gpp(NH)p (118,119). *In vivo* studies in rats and monkeys found a high binding in striata with quick, reversible kinetics. Binding was also blocked by haloperidol pretreatment and increased by depletion of dopamine induced by reserpine pretreatment in rats (118). The same methodology was applied to the two other agonists [^{11}C]PPHT and [^{11}C]ZYY-339, with similar results but lower striatum-to-cerebellum ratios and comparable thalamus-to-cerebellum ratios (119).

[^{18}F]-5-OH-FPPAT

[^{18}F]-5-OH-FPPAT, a fluorinated analog of [^{11}C]-5-OH-DPAT, was designed in 2004. *In vitro* binding competition studies revealed an IC_{50} of 6.95 for this tracer, close to that of its analog 5-OH-DPAT (6.53 nM) but with higher lipophilicity. *In vitro* autoradiography studies on rat brain showed evidence of specific binding to high-affinity state D_2 receptors using Gpp(NH)p pretreatment. *In vivo* PET imaging in rats revealed significant binding in striata, with high brain uptake. Binding studies on rhesus monkey brain slices indicated specific binding in dopaminergic regions, caudate, putamen and thalamus. These findings were confirmed by *in vivo* blockade studies in rats with the agonist PPHT or the antagonist risperidone (120). Finally, *ex vivo* autoradiography on rats with Gpp(NH)p revealed a large decrease in striatal binding, indicating high-affinity state binding of [^{18}F]-5-OH-FPPAT and the newer derivative [^{18}F]5-OH-FHXPAT (121). Further investigations are needed to decipher more precisely the binding of these compounds to dopamine receptors.

AMC derivatives

Structure-activity study of 2-aminomethylchroman-7-ol (AMC) identified a number of agonists with good affinity and selectivity for the high-affinity state of D_2 receptors (122). In 2014, Shalgunov and colleagues (123) tried to develop new D_2/D_3 agonist fluorinated radiotracers using the 2-aminomethylchroman-7-ol structure (123). The fluorinated compounds [^{18}]FBu-AMC13 and [^{18}F]FEt-AMC15 were identified as the most promising radiotracers, with nanomolar affinities of the unlabeled compounds for D_2/D_3 receptors and nearly full agonism in human D_2 receptors. *In vitro* studies revealed specific binding of both radiotracers to high-affinity D_2/D_3 receptors in striatum (124). The team further assessed these compounds in rat brain, and other AMC-13 and AMC-15 homologs with variations on alkyl chains. All showed specific binding in autoradiography *in vitro* using raclopride. Specific binding was also decreased by an excess of GTP, demonstrating that this

corresponds predominantly to the high-affinity state of D_2/D_3 receptors. However, *in vivo* studies showed that only a small proportion of [^{18}F]FEt-AMC15 crossed the BBB. [^{18}F]FBu-AMC13 showed a more optimistic profile, with good BBB penetration. Its analog [^{18}F]FEt-AMC13 showed the highest signal-to-noise ratio, with similar BBB penetration and metabolic profile. However, *in vivo* blockade studies of [^{18}F]FEt-AMC13 with 1 mg/kg of raclopride showed lower displacement than with other ^{11}C-labeled D_2/D_3 tracers. Following the basic structure of (R)-2-(benzylaminomethyl)chroman-7-ol, described by Mewshaw (AMC1), the ^{18}F-fluorine was attached directly to the benzyl function of AMC1 to obtain [^{18}F]AMC 20 so as to improve the stability of the compound in comparison with the previous alkyl derivatives (123). *In vitro* studies found it to be a potent agonist of high-affinity state D_2 receptors, with picomolar affinity. PET imaging in rats showed good BBB penetration and accumulation in striatum. *In vivo* challenge studies with raclopride also demonstrated displacement in striatum, but still in contrast with data obtained with [^{11}C]-D_2/D_3 agonist radiotracers: i.e., percentage occupancy on raclopride injection was lower than with [^{11}C]PHNO or [^{11}C]MNPA). [^{18}F]AMC20 showed higher nonspecific binding than [^{18}F]FEt-AMC13. Finally, the low signal-to noise ratio and a suspected lack of selectivity stopped further development of these molecules.

[^{18}F]MCL-524

Another study focused on a fluoroalkyl derivative of [^{11}C]MNPA (125), [^{18}F]MCL-524, in an attempt to develop the first fluorinated agonist radiotracer of D_2/D_3 receptors. MCL-524 was previously shown to have nanomolar affinity for D_2 high-affinity receptors (126). Finnema et al. showed that [^{18}F]MCL-524 provided similar or even greater contrast between striatum and cerebellum compared to [^{11}C]MNPA. Blocking studies with raclopride and D-amphetamine pre-treatment produced a decrease in binding, in agreement with a previous study with [^{11}C]MNPA, confirming the specificity and agonistic profile of [^{18}F]MCL-524. Radiometabolite analysis showed a metabolism rate comparable to that of [^{11}C]MNPA and [^{11}C]NPA; the detected radiometabolites were polar and unlikely to cross the BBB. Kinetic analysis showed a slight underestimation of BP_{ND} by the MRTM model in comparison to the 1TCM model, deserving further investigation in future human studies. A whole-body distribution study revealed that [^{18}F]MCL-524 radiation dosimetry was in an acceptable range for translation to human trials, and presented an interest for simultaneous PET/fMRI protocols thanks to its longer half-life.

Fluorinated analogs of apomorphine were also synthesized by Zijlstra et al., by labeling the N-alkyl chain with fluorine-18 (Zijlstra et al., 1993b). The three compounds were evaluated in rat brain, but showed disappointing results: [^{18}F]2-OH-FNPA did not cross the BBB while neither [^{18}F]FNEA nor [^{18}F]FNPA demonstrated specific binding to D2 receptors.

Serotonin receptors

5-HT$_{1A}$ Receptors

[^{11}C]CUMI-101 and derivatives

In 2006, the arylpiperazine derivative [^{11}C]MPT was evaluated in baboon and showed specific binding to 5-HT$_{1A}$ receptors *in vivo*, but suffered from very fast metabolism and slow washout, making quantification of binding parameters difficult (127). Its structural analog [^{11}C]CUMI-101 was then tested in baboon and reported to be a promising ligand for imaging 5-HT$_{1A}$ receptors in high-affinity state (128). Subsequent studies further explored its modeling properties in baboons and evaluated [^{11}C]CUMI-101 in humans (129,130). Other studies focused on tracer sensitivity for endogenous serotonin fluctuations in non-human primates (131) and in humans (132), and suggested that tracer uptake is sensitive only to large increases in extracellular serotonin in response to robust pharmacological challenge but under physiological conditions. Another study in humans, using citalopram, showed a slight increase in [^{11}C]CUMI-101 binding in postsynaptic regions, which was interpreted as a possible decrease in 5-HT concentration in these areas (133). The authors also associated [^{11}C]CUMI-101 and the antagonist [^{11}C]WAY-100635 in order to quantify G-protein-coupled 5-HT$_{1A}$ receptors compared to the total receptor pool, and reported an average of 45% of 5-HT$_{1A}$ receptors in coupled state in baboon brain (134). Subsequently, however, two studies questioned the specificity of the tracer, highlighting region-dependent cross-reactivity with α_1 adrenergic receptors. Its pharmacological properties were also questioned, as it behaved as an antagonist in some *in vitro* studies (135,136). Therefore, [^{11}C]CUMI-101 appears rather to be a partial agonist, limiting its potential in the study of high-affinity receptors and possibly explaining its relatively poor sensitivity to serotonin fluctuation. Two recent multimodal studies also used [^{11}C]CUMI-101 PET imaging in combination with fMRI, to study the presynaptic serotonergic modulation of emotional processing (137) and the mechanism of action of citalopram *in vivo* (138). Recent attempts were made to develop a fluorinated analog of [^{11}C]CUMI-101, resulting in the synthesis of [^{18}F]FECUMI-101, a partial agonist of 5-HT$_{1A}$ receptors (E_{max}=77%) with high affinity (K_i=0.1 nM), showing specific binding in non-human primates *in vivo*, although there was unexpectedly high uptake in the thalamus (139,140). However, a subsequent *in vitro* evaluation of the tracer in human brain also showed significant binding to α_1 receptors (136,141). The same team recently described the radiosynthesis of another partial agonist, [^{18}F]FEMPT (142), but no preclinical evaluation of this radiotracer has yet been published.

5-HT2A Receptors

Fluorinated analogs of [^{11}C]Cimbi-36

In 2016, the same team reported the synthesis and evaluation of 3 fluorine-containing derivatives of Cimbi-36. Although all were potent 5-HT_{2A} agonists, none had satisfying properties for PET neuroimaging, due either to excessive radiometabolite signal or to non-specific binding (143) . Five other analogs were evaluated and did not display specific binding, although all entered the pig brain (144). Finally, 2 new analogs were evaluated in 2017, leading to unsuccessful displacement challenges with a 5-HT_{2A} antagonist (145). In 2015, Prabhakaran et al. reported the synthesis of another fluorinated analog, [^{18}F]FECIMBI-36. Specific binding to 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors was shown *in vitro* on postmortem human brain slices (146). [^{18}F]FECIMBI-36 was evaluated in non-human primates; results showed low brain penetration (147).

5-HT2C Receptors

In 2013, Granda et al. reported the synthesis and evaluation of several methylated arylazepine derivatives as potential 5-HT_{2C} agonists radiolabeled by ^{11}C for PET neuroimaging. The most promising agonist was administered in baboons and showed high brain penetration but no evidence of specific binding (148). [^{11}C]-radiolabelling of two potent and selective 5-HT_{2C} full agonists, WAY-163909 and vabicaserin, via Pictet-Spengler cylization, was reported in 2014. Both [^{11}C]WAY-163909 and [^{11}C]vabicaserin showed a high brain uptake and non-specific binding in rodent and non-human primate (23).

More recently, 4-(3-[^{18}F]fluorophenethoxy)pyrimidine ([^{18}F]-FPP) appeared to be a promising radiotracer of 5-HT_{2C} receptors (149). This compound was previously reported to exert an agonistic effect on this receptor (E_{max}=88%) and to have reasonable selectivity over other serotonin receptors (150). It showed high brain uptake and specific binding to 5-HT_{2C} receptors in rat, being decreased by co-administration of lorcaserin (although at a high dose of 10 mg/kg).

Other Serotonergic Receptors

No agonist radiotracer is yet available for PET neuroimaging of other serotonergic GPCR, despite several attempts with 5-HT_4 receptors (151) and 5-HT_7 receptors (152).

Muscarinic receptors

M1 receptor

[^{18}F]FP-TZTP

In 1993, Halldin et al. reported [^{11}C]-radiolabeling of xanomeline and butylthio-TZTP, two muscarinic agonists selective for the M_1 receptor (153). Both compounds were further evaluated in cynomolgus monkey and human brain as PET radioligands and drug candidate (154). They showed high brain uptake but limited washout in humans, which is not optimal for quantification of a PET radiotracer. Moreover, the low cortical-to-cerebellar ratio of both compounds and the affinity of butylthio-TZTP for σ_1 receptors led the authors to conclude that they were not promising ligands for PET neuroimaging.

[^{11}C]LSN3172176

Recently, another team reported the discovery and evaluation of two selective M_1 receptor agonists deriv ed from oxindole, LSN3172176 and LSN3262527 (155,156). High BP values were found for both molecules in *ex vivo* experiments using LC-MS-MS analysis in rats and control mice, with much lower values in M_1 KO mice. Both agonists were radiolabeled with ^{11}C and showed specific binding in rhesus monkeys *in vivo*. Further kinetic modeling experiments with [^{11}C]LSN3172176 were performed in rhesus monkeys and showed reliable estimates of distribution volumes using the 1-tissue compartment model (157). Scopolamine pretreatment blocked the signal, with occupancy of 98.5%. Further pharmacological characterization of [^{11}C]LSN3172176 in human, rat or mouse cortical membranes showed it to be a partial agonist, with an efficacy range of 43-73% (156).

[^{11}C]AF150(S)

In 2013, AF150(S), an M_1 receptor agonist analog to cevimeline, was radiolabeled with ^{11}C and evaluated as a PET tracer in rodent brain (151). The results were encouraging, with higher uptake in M_1 receptor-rich areas and specific binding demonstrated by blocking experiments. [^{11}C]AF150(S) was also sensitive to changes in endogenous acetylcholine levels induced by rivastigmine.

Cannabinoid receptors

CB1 receptors

[^{11}C]MePPEP

In 2008, Yasuno et al. reported the radiosynthesis and evaluation of [^{11}C]MePPEP, ((3R,5R)-5-(3-methoxy-phenyl)-3-((R)-1-phenyl-ethylamino)-1-(4-trifluoromethyl-phenyl)-pyrrolidin-2-one), a new inverse agonist of CB_1 receptors (158). *In vitro* and *in vivo* preclinical studies showed high brain uptake in monkey brain, high specific binding on blocking studies, and rapid clearance. Quantification of distribution volumes using a 2-tissue compartment model gave satisfactory results despite the lack of identification of a reference region for simplified quantification. In a further study, the authors confirmed the previous findings regarding specificity in rodent brain (although CB_1 knock-out mice showed about 35% non-specific binding), and that it was not a PgP substrate (159). Importantly, displacement studies showed that the tracer was more potently displaced by inverse agonists than agonists. These results suggest a large receptor reserve or different binding sites for inverse agonists and agonists. The first test in healthy human volunteers was conducted in 2009 (160) Finally, the authors developed fluorinated derivatives, and first-in-man studies with [^{18}F]FMPEP-d2 demonstrated better precision and accuracy than [^{11}C]MePPEP (161).

Other cannabinoid agonists

Two potent inverse agonist radiotracers were partially investigated through preclinical *in vitro* and *in vivo* studies, with promising results for imaging CB_1 receptors: [^{11}C]CB-119 (162) and [^{11}C]SD 5024 (163,164). A full agonist of CB_1 and CB_2 receptors, AZD1490, was also radiolabeled with carbon-11 and evaluated in monkey brain for a microdosing study. The relatively low brain uptake and homogeneous distribution did not support any potential application as a radiotracer (165).

Opioid receptors

κ and μ receptors

[^{11}C]PEO

In an attempt to develop an agonist radiotracer structurally closer to [^{11}C]diprenorphine, synthesis and preclinical evaluation of the full-agonist orvinol [^{11}C]PEO, was reported in 2009 (166). The compound showed specific and selective binding to μ receptors in rats, and slight binding to kappa receptors. A [^{18}F]-labeled derivative was synthesized (167) and evaluated in rats, and showed full-agonist properties and high affinity for all subtypes of opioid receptors (168).

All opioïd receptors

[^{11}C]buprenorphine

The partial μ-agonist buprenorphine (which is also an antagonist of kappa and delta receptors) was radiolabeled with ^{11}C and compared with the antagonist [^{11}C]diprenorphine in mouse and baboon brain (169). Distribution patterns were similar and consistent with the known distribution of receptors, but striatum-to-cerebellum ratio was lower with [^{11}C]buprenorphine than [^{11}C]diprenorphine, because of slower washout from regions devoid of receptors. Another study in baboons showed tracer displacement by naloxone, confirming it as a suitable radiotracer of opioid receptors (170), although its non-selectivity for the different opioid receptors limits its usefulness.

Adenosine Receptors

A1 Receptor

The first potential agonist radiotracer for A_1 receptor PET imaging was developed recently (171). A series of compounds were evaluated for their affinity and selectivity for A_1 receptors compared to other adenosine receptor subtypes, and their functional efficacy in A_1 receptors was measured. A 3,5-dicyanopyridine derivative with good selectivity for A_1 receptors was selected for radiolabeling with ^{11}C, although its efficacy was only partial (Emax=16%). The radiolabeled molecule displayed specific binding to A_1 receptors in rat brain *in vivo*. A fluorinated analog of adenosine, [^{18}F]FNECA, was previously evaluated and showed a distribution pattern consistent with A_1 receptors *in vitro*; however, it had very low brain uptake in rabbit *in vivo* (172).

A2A Receptor

In 2017, a new class of fluorinated A_{2A} receptor agonists was derived, based on the potent and selective agonist ATL-313 (173). FDA-PP1 and FDPA-PP2 displayed submicromolar affinities and agonistic properties, as sodium, which stabilizes the inactive conformation, decreased their affinities. However, no further evaluation of the radiolabeled compounds has yet been reported.

GABA Receptors

$GABA_B$ receptors

Contrary to the other GABA receptor subtypes, $GABA_B$ receptors belong to the GPCR family. Several attempts to develop specific $GABA_B$ radiotracers, including agonists, have been made. ^{11}C-radiolabeling of baclofen using Michael addition of nitromethane was reported in 2009 (174) but exhibited negligible brain permeability. New fluoropyridyl ether analogs of baclofen were synthesized and evaluated recently (175). The compound showing the highest affinity and greatest agonist response, (R)-4-amino-3-(4-chloro-3-((2-fluoropyridin-4-yl)methoxy)phenyl)butanoic acid, was radiolabeled with ^{18}F and studied in mice. It showed moderate brain uptake in mice and about 35% specific binding, justifying further development of improved $GABA_B$ agonist radiotracers in the future.

CHAPITRE 5 : LE [^{18}F]F13640, UN NOUVEAU RADIOTRACEUR AGONISTE DES RECEPTEURS 5-HT$_{1A}$

Ce chapitre introduit la partie expérimentale de notre travail, en resituant le contexte de la recherche sur le sujet des radiotraceurs agonistes des récepteurs 5-HT$_{1A}$, débuté il y a plusieurs années par l'équipe BIORAN et dont le passage chez l'Homme, présenté ultérieurement, a constitué l'un des points saillants. Tel que cela va être présenté, la genèse de ce radiopharmaceutique a associé de nombreuses interactions multidisciplinaires entre le monde académique et le monde industriel de la recherche en pharmacologie.

I. Vers le premier radiotraceur agoniste 5-HT$_{1A}$

A. Pharmacologie des récepteurs 5-HT$_{1A}$

Les récepteurs 5-HT$_{1A}$, découverts dans les années 1980, sont les plus étudiés parmi les récepteurs sérotoninergiques. La distribution cérébrale de ces récepteurs a été mise en évidence par des autoradiographies à l'aide de radioligands spécifiques (antagonistes) tels que le [^{3}H]8-OH-DPAT ou le [^{3}H]WAY-100635 (176). Les premières études d'imagerie fonctionnelle de ces récepteurs ont utilisé le [^{11}C]WAY-100635 en TEP dans le cerveau humain (177). Les récepteurs 5-HT$_{1A}$ sont très largement présents dans le système nerveux central et périphérique. Les aires limbiques telles que le septum latéral et surtout l'hippocampe contiennent une densité importante de récepteurs, ainsi que certaines aires corticales (particulièrement le cortex entorhinal et le cortex cingulaire), et les noyaux du raphé dorsal, où sont situés les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques. On retrouve également des récepteurs, en densité plus faible, dans l'hypothalamus et le thalamus et au niveau du tronc cérébral. Dans le cervelet et des ganglions de la base (striatum, noyau caudé, putamen) la densité en récepteurs est faible (178). Ces récepteurs peuvent être localisés soit au niveau post-synaptique, où ce sont des hétérorécepteurs sur des neurones glutamatergiques pour les aires limbiques et corticales, et cholinergiques pour le septum latéral, soit au niveau somato-dendritique, où ce sont des autorécepteurs au niveau du raphé sur les corps cellulaires sérotoninergiques. Ces autorécepteurs régulent le tonus sérotoninergique par un rétrocontrôle négatif : leur activation réduit le taux de décharge des neurones (179). Sur le plan pharmacologique, les récepteurs 5-HT$_{1A}$ sont couplés aux protéines G (préférentiellement aux protéines Gi/o). Lors de la fixation d'un ligand

sur le récepteur, le GDP lié à la sous-unité alpha de la protéine G est remplacé par du GTP, ce qui entraîne une cascade réactionnelle intracellulaire se traduisant par des modifications de l'activité du neurone. Le GTP est ensuite hydrolysé en GDP par une GTPase, ce qui correspond à l'arrêt du signal.
En plus de la diversité régionale des récepteurs 5-HT_{1A}, il faut noter que ces récepteurs peuvent exister selon deux conformations différentes : une conformation à haute affinité pour la 5-HT, où le récepteur est couplé à sa protéine G, et une conformation à basse affinité où le récepteur est découplé de sa protéine G et non fonctionnel (180,181). Cette caractéristique est importante car elle sera mise à profit pour l'imagerie, tel que décrit ultérieurement. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont impliqués dans des processus physiologiques divers, ainsi que dans la physiopathologie de troubles psychiatriques et neurologiques. Ils sont notamment très étudiés pour leur importance sur le plan thérapeutique. De nombreux agents pharmacologiques ciblant ces récepteurs ont été développés (182) allant d'antagonistes promnésiques, à des agonistes anxiolytiques, des antidépresseurs ou des antalgiques (tel le F13640). Par ailleurs, on connait depuis longtemps leur implication dans la réponse thérapeutique de la pathologie dépressive. On soupçonne les autorécepteurs inhibiteurs des noyaux du raphé d'être responsables du retard thérapeutique observé avec les antidépresseurs classiques tels les ISRS (183). De par leur importance fonctionnelle, les récepteurs 5-HT_{1A} peuvent constituer des biomarqueurs intéressants dans de nombreuses pathologies, par leur visualisation en TEP *in vivo* ou autoradiographie *in vitro* grâce au développement récent de radiotraceurs spécifiques (184).

B. Les radiotraceurs 5-HT_{1A}

Actuellement, les radiotraceurs les plus utilisés pour l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} chez l'humain sont le [^{11}C]WAY100635, et le [^{18}F]MPPF, deux antagonistes qui présentent une bonne sélectivité et une haute affinité pour ces récepteurs, aux niveaux pré et postsynaptiques. Plusieurs études d'imagerie ont pu montrer des modifications significatives de la liaison aux 5-HT_{1A} dans des troubles psychiatriques comme la dépression majeure et la schizophrénie (185). D'autres études se sont intéressées à l'exploration des 5-HT_{1A} dans les maladies neurodégénératives. Dans la maladie d'Alzheimer, la plupart de ces études TEP ont montré une diminution de la densité de récepteurs dans l'hippocampe chez des patients à un stade avancé de la maladie (186,187). Dans les stades pré-démentiels cependant, les résultats sont divergents, ce qui pourrait être expliqué par des mécanismes compensatoires impliquant les 5-HT_{1A} dans les stades précoces (188,189). Un certain nombre de données suggèrent que l'état de couplage des récepteurs à leur protéine G peut être modifié au cours des maladies neurodégénératives (190,191). En d'autres termes, si les récepteurs sont bien présents dans leur totalité, la proportion de récepteurs couplés aux protéines G (fonctionnels d'un point de vue neurophysiologique ou pharmacologique) varierait par rapport à la

proportion de récepteurs découplés (qui ne transmettent plus de signal). Cette caractéristique met en évidence la limite actuelle de l'imagerie TEP des récepteurs cérébraux. En effet, la totalité des radiotraceurs cliniques en TEP (ou radiopharmaceutiques) sont des antagonistes. Or, comme expliqué dans les chapitres précédents, les antagonistes se fixent indifféremment sur les récepteurs couplés aux protéines G et sur les récepteurs non couplés aux protéines G (192). En d'autres termes, les radiopharmaceutiques TEP des récepteurs cérébraux permettent de visualiser et quantifier la totalité des récepteurs présents, sans distinguer les récepteurs fonctionnels des récepteurs non actifs.

C. Développement des radiotraceurs agonistes 5-HT_{1A}

Au contraire, les agonistes (endogènes comme les neurotransmetteurs ou exogènes comme des ligands chimiques) montrent une préférence de fixation pour les récepteurs fonctionnels (176). Nous avons mis cette caractéristique pharmacologique à profit pour proposer l'utilisation d'agonistes TEP des récepteurs 5-HT_{1A} permettant de visualiser spécifiquement les récepteurs fonctionnels au sein d'une structure cérébrale et, de manière longitudinale, au décours d'une pathologie (193). De plus, un agoniste est théoriquement plus sensible à des variations de concentrations extracellulaires du neurotransmetteur (en compétition directe puisqu'il se fixe sur la sous-population de récepteurs). Un agoniste TEP pourrait donc permettre une mesure dynamique des fluctuations de libération du neurotransmetteur, en comparant deux situations expérimentales contrôlées chez un même volontaire sain (128,193). De nombreuses tentatives ont eu lieu pour développer un tel agoniste, avec un succès limité. Une des molécules les plus prometteuses, le [^{11}C]CUMI-101, développée par une équipe américaine, avait montré des résultats encourageants lors des premières évaluations *in vivo* chez l'homme (130). Cependant, des études récentes ont montré que le [^{11}C]CUMI-101 n'est pas un agoniste pur mais a un comportement d'antagoniste chez le primate et l'humain, ainsi qu'une liaison significative aux récepteurs alpha-1 adrénergiques (135,136). Ces propriétés pharmacologiques ont donc écarté ce radiopharmaceutique. Il apparait donc nécessaire de rechercher d'autres agonistes TEP 5-HT_{1A}. La demande est d'autant plus marquée qu'il n'existe pas à ce jour de radiopharmaceutique agoniste radiomarqué au fluor-18, c'est-à-dire avec une demi-vie radioactive plus longue que celle du carbone-11. Un tel isotope est en effet plus facile d'emploi avec une possibilité, à terme, de distribution à des sites de recherche clinique distincts du site de production.

D. Radiotraceurs agonistes « de la série des F »

Notre équipe a repéré en 2009 une nouvelle famille d'agonistes spécifiques des 5-HT_{1A}, développés initialement comme médicament-candidat par les laboratoires Pierre Fabre à Castres (194). Ces agonistes « F15 », initialement développés comme antidépresseurs, présentent des caractéristiques intéressantes qui en font de bons candidats comme radiotraceurs TEP 5-HT_{1A}. En effet, ils possèdent une grande affinité et une très haute sélectivité pour ces récepteurs, et comportent dans leur structure commune un atome de fluor aisément remplaçable par un atome de fluor 18 radioactif au cours du processus de radiomarquage. Une des molécules de cette série, le [^{18}F]F15599, fut testée pour la première fois au CERMEP comme traceur TEP chez le rat et le chat (139). Elle présentait des propriétés intéressantes *in vitro*, caractéristiques d'un agoniste, mais l'intensité du marquage *in vivo* était trop faible, probablement dû à son affinité insuffisante pour le récepteur (Ki=2.24 nM). La seconde molécule testée chez le rongeur, le chat et le primate, le [^{18}F]F13714, possédait une spécificité similaire pour les 5-HT_{1A} et une affinité remarquablement élevée (Ki < 0.1 nM). Cette fois-ci, cette très haute affinité a été défavorable à l'imagerie TEP. En effet, la liaison aux récepteurs étant quasi-irréversible, le calcul des paramètres pharmacocinétiques a été jugé trop complexe pour une quantification TEP (195,196). Notre équipe s'est focalisée sur un troisième candidat, le F13640, molécule chimiquement très proche des précédentes mais dans les caractéristiques de binding sont, a priori, plus « équilibrées » pour constituer un bon candidat pour l'imagerie TEP (Ki = 1nM chez le rongeur (196)).

II. Histoire thérapeutique du F13640

A. Propriétés analgésiques du F13640 ou béfiradol

Dans le cadre du screening moléculaire de médicaments agonistes 5-HT_{1A}, le laboratoire Pierre Fabre a identifié une série de médicaments candidats chimiquement très proches, « la série des F » dont le F13714, le F15599 et le F13640. Le F13640 ou béfiradol a été identifié comme agoniste 5-HT_{1A} avec des caractéristiques pharmacologiques, une spécificité et une affinité satisfaisante (Ki=1nM) (197,198), un pattern d'activation 5-HT_{1A} démontré (199,200). Le rationnel le plaçant comme candidat médicament analgésique est le suivant : la mise en jeu du signal nociceptif induit deux réponses paradoxales (201). Une réponse de type analgésique et une seconde hyperalgique. Ceci explique le phénomène de tolérance observé avec les opioïdes. En effet, en usage chronique, la composante hyperalgique prend le dessus sur la composante analgésique. La propriété agoniste 5-

HT_{1A} a été identifiée comme effecteur inverse des opioïdes sur ce système. En traitement chronique chez l'animal, Le F13640 a été identifié comme inducteur d'une hyperalgie suivie d'une analgésie (199,202). Dans les modèles précliniques de douleur nociceptive et d'allodynie neuropathique, l'administration chronique provoque une analgésie (199,203) prolongée concurrencée uniquement par les opioïdes (199,204). Le F13640 a donc été évalué chez l'homme jusqu'en phase II (Eudra CT n°2009-012123-28) avec pour indication les douleurs neuropathiques sévères du diabétique. Les résultats de cet essai n'ont pas montré d'efficacité analgésique par rapport au groupe placebo (205). Une raison évoquée de cet échec pourrait être que ses propriétés anti-nociceptives, anti-allodyniques et anti-hyperalgésique s'adressent préférentiellement à la douleur tonique (206).

B. Réorientation thérapeutique du F13640 ou NLX112

Avec la reprise des licences inexploitées des molécules 5-HT_{1A} de la série des F par la société Neurolixis.inc (responsable scientifique et CEO, Dr Adrian Newman-Tancredi), des propriétés antidyskinétiques du F13640 (nouvellement appelé NLX112) ont été mis en évidence sur des modèles de rats hémiparkinsoniens (207,208). Le mécanisme mis en jeu serait une régulation de la transmission dopaminergique dans le striatum par les neurones sérotoninergiques. Par ailleurs, des propriétés antidépressives par action sur le cortex préfrontal ont été démontrés sur un modèle de rat (209) et de singe (210). Actuellement, le F13640 est développé vers une phase clinique IIa avec pour indication, les dyskinésies du parkinsoniens induites par la dopathérapie.

C. Développement du [^{18}F]F13640

Dans le contexte de notre collaboration avec Neurolixis.inc, de la réorientation thérapeutique du NLX112 et des caractéristiques prometteuses du [^{18}F]F13640 citées plus haut, une collaboration avec notre laboratoire et Neurolixis.inc a été initiée pour synthétiser l'équivalent radiopharmaceutique du candidat médicament.

Cette collaboration présentait dès le départ un objectif double. D'une part, utiliser le radiopharmaceutique pour contribuer au développement du médicament équivalent. Comme développé dans le chapitre 1, il est possible de valider les cibles cérébrales du médicament par réalisation d'étude de biodisponibilité, de « target engagement », de « target occupancy » avec son radiotraceur équivalent. L'objectif était ici d'enrichir le Dossier du Médicament Expérimental (DME) du médicament pour accélérer son processus de développement pour son passage à l'homme.

D'autre part, nous y avons vu une opportunité d'utiliser de façon inédite un radiotraceur agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} et de définir les contours de son utilisation comme un véritable outil en neuropharmacologie, tel que cela va être présenté ultérieurement.

III. Etat de l'art des données expérimentales des données du [^{18}F]F13640

A. Données *in vitro* du [^{3}H]F13640

Les premières études réalisées avec le F13640 tritié indiquent un K_d de 1.8 nM dans les expériences de saturation (198). Les expériences de compétition [^{18}F]F13640 avec le F13640 froid déterminent une constante de dissociation k_{off} à 0.05 min^{-1} et un K_d associé de 1.4 nM. A titre de comparaison avec l'agoniste 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, sa constante k_{off} était de 0.25 min^{-1} associée à un K_d de 0.37 nM. Ces données *in vitro* présagent de la cinétique lente mise en évidence par les premières expériences réalisées avec le [^{18}F]F13640.

B. Preuve de la liaison du [^{18}F]F13640 aux récepteurs couplés

La liaison du [^{18}F]F13640 aux récepteurs couplés a été vérifiée par autoradiographie. Les conditions étaient les suivantes : une série de lames contrôle [^{18}F]F13640 et une série de lame [^{18}F]F13640 incubée avec un agent découplant le Gpp(NH)p, un analogue non hydrolysable de la guanosine 5'triphosphate. Le même type d'expérience a été réalisé avec le [^{18}F]MPPF. Les résultats indiquent une diminution drastique de la liaison du [^{18}F]F13640 incubé avec la substance découplante (54% dans le cortex cingulaire, 47% dans l'hippocampe et le noyau dorsal du raphé). Dans les mêmes conditions, la liaison du [^{18}F]MPPF, antagoniste TEP, est inchangée (Figure 40).

Figure 40 : comparaison des effets du découplage sur la liaison du [^{18}F]F13640 (agoniste) et le [^{18}F]MPPF (antagoniste) en autoradiographie ex vivo sur cerveau de rat (211).

C. Expériences de compétition et de blocage

Les expériences d'autoradiographies sur lames de cerveaux de rats montrent un déplacement compétitif et dose-dépendant du radiotraceur par la sérotonine et par le WAY-100635 (Figure 41).

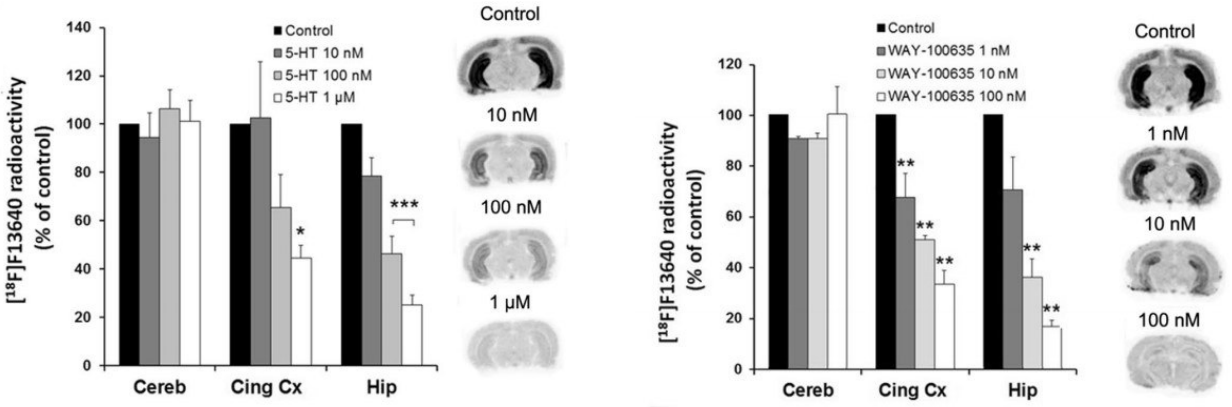


*Figure 41 : autoradiographie de lames de cerveaux de rats incubées avec le [18F]F13640 et des concentrations croissantes de WAY-100635 (n=3) et et de sérotonine (n=3). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique comparés au contrôle +/- SEM (*p<0.05 ;** p<0.01 ;***p<0.001, versus control ; Test ANNOVA suivi du test post hoc de Dunnett's). Cing Cx Cingulate cortex, Hip Hippocampus (211).*

In vivo les données TEP issues du modèle rat, chat et primate indiquent une cinétique d'entrée cérébrale rapide et une élimination lente attendues au vu des données *in vitro* citées plus haut. Comme en autoradiographie, la liaison du radiotraceur est réversible. Les co-injections de l'antagoniste 5-HT_{1A} WAY 100-635 et pré-injection de l'agoniste 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT diminuent la liaison du [^{18}F]F13640 (Figure 42). Les régions montrant une forte liaison et un déplacement dans les expériences de prétraitement ou de co-traitement sont le cortex cingulaire antérieur, l'insula, les amygdales, le septum latéral, l'hippocampe, le cortex entorhinal, le thalamus, le noyau du pont et la matière grise du cervelet.

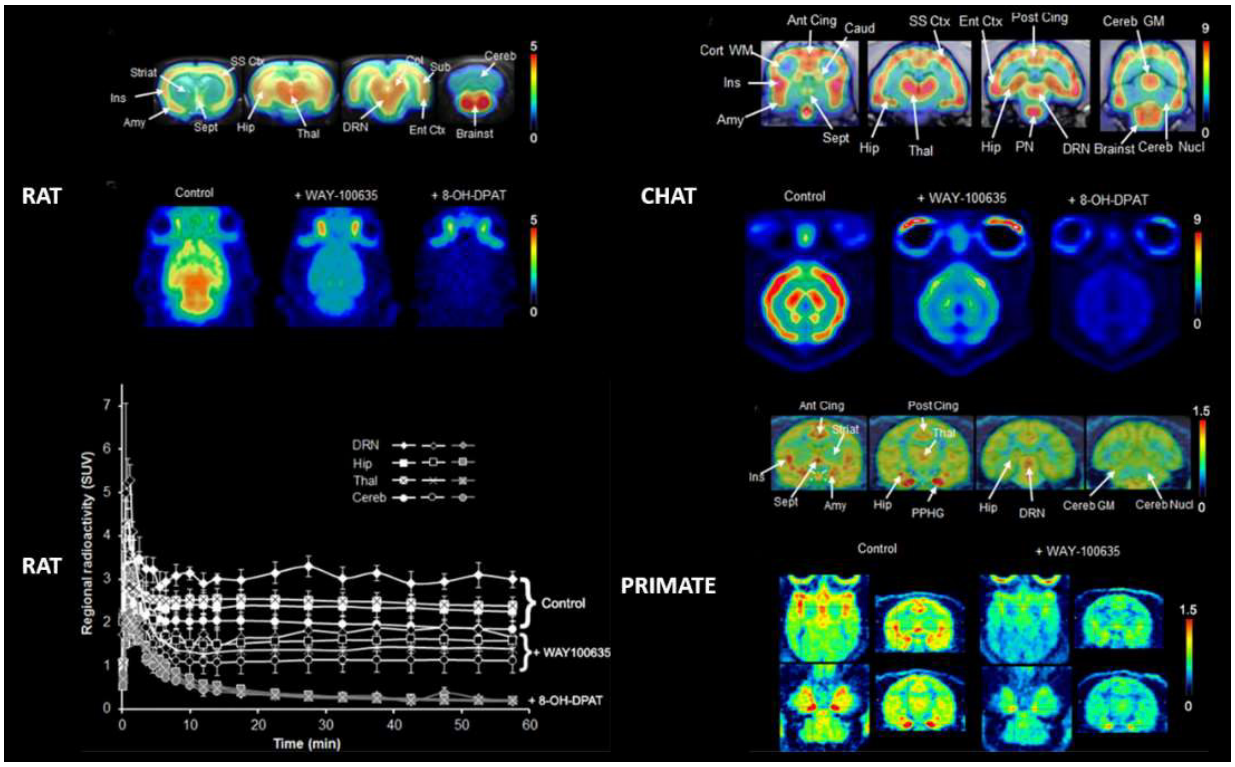


Figure 42 : imagerie TEP contrôle du [18F]F13640 chez le rat, le chat et le primate. Imagerie TEP du cerveau de rat avec co-injection de WAY-100635 (2 mg/kg) et pré-injection de 8-OH-DPAT (2 mg/kg) ; Imagerie TEP du cerveau de chat avec pré-injection de WAY-100635 (2 mg/kg) et pré-injection de 8-OH-DPAT (1 mg/kg) (N=2) ; Imagerie TEP du cerveau de primate avec pré-injection of WAY100635 (2 mg/kg). ; Cinétique contrôle du radiotraceur chez le rat, avec co-injection et pré-injection associées (211).

D. Utilisation du [^{18}F]F13640 dans la maladie d'Alzheimer

Les premières études encourageantes réalisées avec le [^{18}F]F13640 ont conduit à le tester comme outil pharmacologique dans la maladie d'Alzheimer (MA). Les données de la littérature indiquent que le système sérotoninergique est hautement dysfonctionnel dans la MA, et cela pourrait être lié à des troubles cognitifs associés à la démence.

Parmi les divers récepteurs de la sérotonine, les récepteurs 5-HT$_{1A}$ sont pertinents pour la MA car ils sont fortement exprimés dans l'hippocampe humain et sont connus pour être impliqués dans la régulation des processus de mémoire (185,212). Étant donné que le premier déficit cognitif sévère de la MA concerne la mémoire épisodique liée aux enchevêtrements neurofibrillaires dans l'hippocampe (213), plusieurs études ont porté sur le statut du récepteur 5-HT$_{1A}$ dans l'hippocampe de patients vivants atteints de MA par imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP), montrant une

diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe des patients atteints de MA avancée (186). Au contraire, notre laboratoire avait signalé une régulation à la hausse des récepteurs 5-HT_{1A} au stade de la déficience cognitive légère (MCI), prodromique de la MA (214). Cette sur expression de récepteur a notamment été objectivée par une étude TEP avec l'antagoniste [^{18}F]MPPF(188). La signification physiopathologique de ce phénomène reste donc à élucider et pourrait refléter des mécanismes compensatoires, par exemple la réserve cognitive, survenant aux premiers stades de cette maladie neurodégénérative (215). Une meilleure compréhension du rôle fonctionnel des récepteurs 5-HT_{1A} dans la MA peut être acquise en prenant en compte des aspects supplémentaires de leur profil pharmacologique. Dans une étude préliminaire autoradiographique sur lame de cerveau humains comparant le [^{18}F]F13640 à l'antagoniste [^{18}F]MPPF, notre laboratoire a montré que l'état de couplage des récepteurs 5-HT_{1A} est modifié (évalué par le [^{18}F]F13640) avant la perte des récepteurs eux-mêmes (évalué par le [^{18}F]MPPF) dans la MA (Figure 43) (196,216). Cette étude montre que la comparaison de la liaison au récepteur 5-HT_{1A} détectée par les radiopharmaceutiques antagonistes et un agoniste peut fournir des informations supplémentaires concernant la proportion de « récepteurs fonctionnels » pendant la maladie d'Alzheimer. L'utilisation du [^{18}F]F13640 a permis d'ajouter un niveau de compréhension en neuropharmacologie, il identifie les récepteurs fonctionnels.

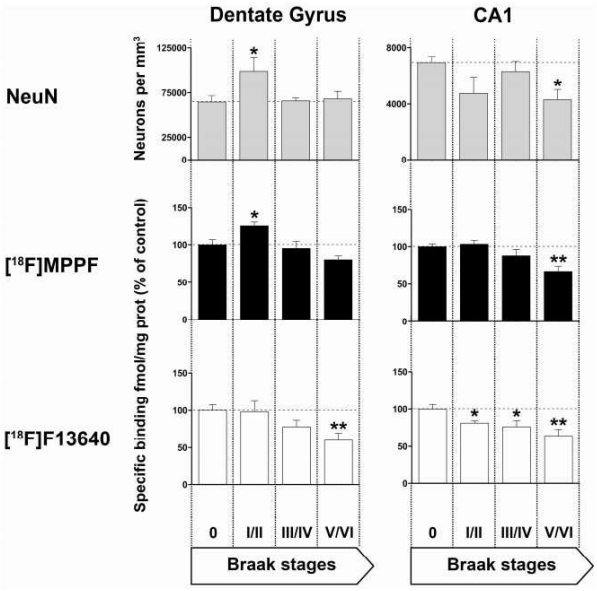


*Figure 43 : densité neuronale (révélée par immunocoloration NeuN), densité de récepteurs 5-HT_{1A} (selon la liaison du [^{18}F] MPPF) et densités de récepteurs fonctionnels (selon la liaison du [^{18}F]F13640) dans le gyrus denté et les zones CA1 de patients atteints de la maladie d'Alzheimer à différents stades de Braak. Les résultats sont exprimés en pourcentage du groupe témoin (Braak stade 0). * p <0,05; ** p <0,01, test t non paramétrique de Mann-Whitney (216).*

E. Sensibilité du [^{18}F]F13640 à la libération de sérotonine induite par fenfluramine

Comme évoqué précédemment, le statut d'agoniste du [^{18}F]F13640 pourrait lui conférer une sensibilité plus importante à la libération de sérotonine par rapport à son homologue antagoniste le |^{18}F]MPPF. Avant le travail de thèse, une seule étude en autoradiographie *ex vivo* avec des concentrations croissantes de fenfluramine montrait une sensibilité significative et dose dépendante du [^{18}F]F13640 (211). Ce n'était pas le cas pour |^{18}F]MPPF qui ne présentait pas de sensibilité significative (Figure 44).

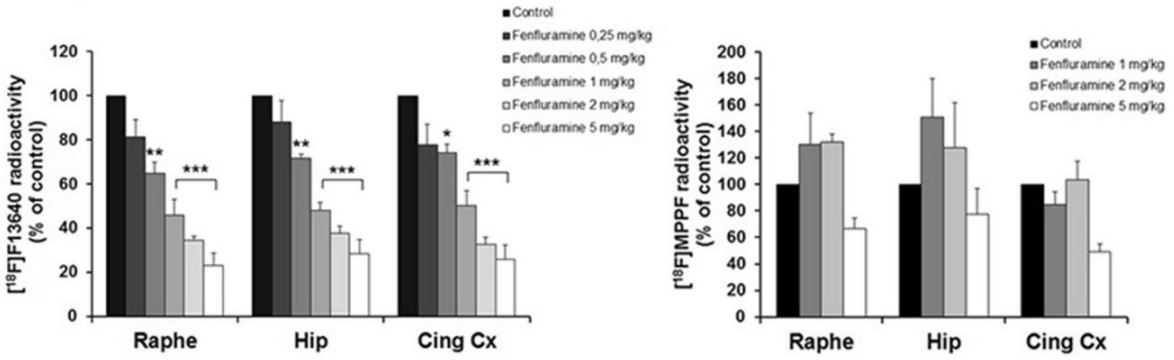


*Figure 44 : comparaison des effets de l'administration de fenfluramine a des doses croissantes de fenfluramine sur la liaison du [18F]F13640 et du |18F]MPPF sur le cerveau de rat (n=3). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique comparés au contrôle +/- SEM (*p<0.05 ;** p<0.01 ;***p<0.001, versus control ; Test ANNOVA suivi du test post hoc de Dunnett's). Cing Cx cingulate cortex, Hip Hippocampus.*

IV. Conclusion

Les premières données du développement du [^{18}F]F13640 indiquent une liaison spécifique au récepteurs 5-HT$_{1A}$ couplés aux protéines G. La cinétique d'entrée cérébrale est rapide et son élimination est lente et réversible. Les premières expériences réalisées sont tout à fait encourageantes et invitent à tester *in vivo* la sensibilité du radiotraceur à la sérotonine devant les résultats contrastés obtenus avec les radiotraceurs antagonistes. Cette problématique sera abordée dans le chapitre suivant. Par ailleurs, le [^{18}F]F13640 apparaît comme un outil de pharmacologie fonctionnelle pour évaluer le couplage des récepteurs dans les désordres psychiatriques et neurologiques impliquant les récepteurs 5-HT$_{1A}$.

CHAPITRE 6 : EVALUATION DE LA SENSIBILITE DU [^{18}F]F13640 A LA LIBERATION DE SEROTONINE

Après avoir rappelé les principales propriétés radiopharmacologiques du [^{18}F]F13640, notamment en termes de sensibilité in vitro aux variations de sérotonine, nous proposons ici d'évaluer de façon inédite sa sensibilité à la libération de sérotonine sur un modèle animal félin.

I. Introduction

A. Sélection de l'agent libérateur de sérotonine

Tel que cela va être décrit, différentes approches pharmacologiques ont été décrites pour provoquer une augmentation de la concentration extracellulaire de sérotonine. Nous avons choisi la fenfluramine car elle possède les propriétés les plus favorables pour la cible des récepteurs 5-HT_{1A} : K_i 5-HT_{1A}<K_i 5HT_{1B}<K_i 5-HT_{2A} (217).

En effet, la fenfluramine est un substrat du transporteur de la sérotonine (SERT); elle accroît les concentrations de sérotonine extracellulaire par inhibition du SERT et favorise les échanges réverses du neurotransmetteur par ces mêmes transporteurs (218,219). La fenfluramine a été régulièrement utilisée dans notre laboratoire, confortant une littérature rapportant des mesures de sérotonine en microdialyse, essentiellement sur des modèles de rats. Ces données montrent un effet transitoire de la cinétique du relargage et une hétérogénéité de la réponse selon les régions cérébrales concernées.

B. Plan expérimental de l'étude

Nous proposons le plan expérimental suivant réalisé sur notre modèle félin. Chaque chat a un examen TEP en condition de contrôle et un examen avec un challenge pharmacologique à la fenfluramine injectée 30 minutes après le début de l'acquisition. Enfin une expérience de prétraitement à la fenfluramine 30 minutes avant l'acquisition est réalisée.

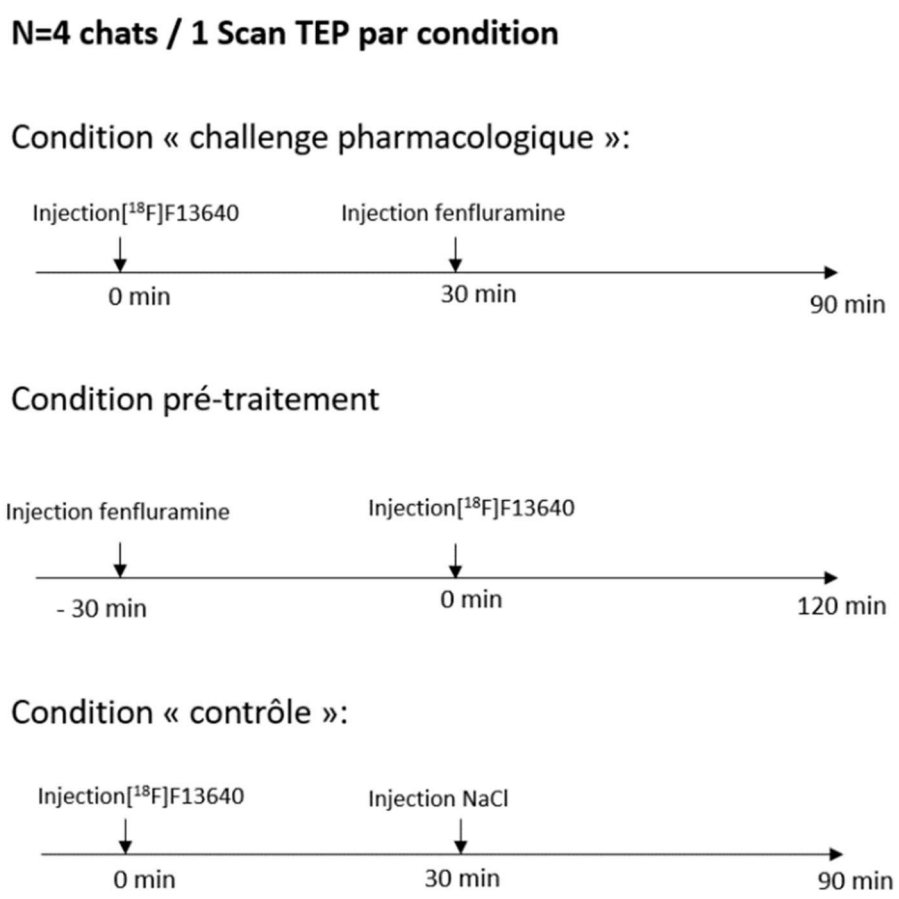


Figure 45 : plan expérimental de l'étude sur chat anesthésié.

La condition de challenge pharmacologique a pour objectif de déterminer s'il y a un déplacement dynamique de [^{18}F]F13640 pendant l'acquisition induit par la libération massive de sérotonine. La fenfluramine a un effet sur le flux sanguin cérébral, notamment dans le cortex frontal et le cortex cingulaire. Cet effet a été mis en évidence par le [^{18}F]FDG (220) et le [^{15}O]H_2O (221). Ainsi, au cours d'un challenge pharmacologique, il y a un phénomène de compétition du [^{18}F]F13640 avec la sérotonine mais très probablement également l'augmentation du « wash-out » du traceur provoqué par l'augmentation du flux sanguin cérébral induit par la fenfluramine. Ce dernier est en effet non spécifique et confondant dans notre étude. Pour cela, nous proposons une condition avec un pré-traitement consistant en la réalisation d'une acquisition TEP à distance de l'injection de fenfluramine pour isoler d'avantage le phénomène de compétition par rapport au phénomène de chasse qui pourrait s'exercer via l'augmentation du flux cérébral. Si l'on met en évidence un déplacement dynamique du traceur dans la condition challenge pharmacologique ainsi qu'une diminution de sa liaison en condition pré-traitement, on pourra suggérer que le radiotraceur est sensible à la libération de neurotransmetteur. Enfin, la méthode optimale voudrait que l'on réalise un protocole de bolus perfusion pour assurer un équilibre du radiotraceur dans les régions cérébrales (222).

Toutefois, au vu des cinétiques très lentes d'élimination du radiotraceur, nous n'avons pas jugé nécessaire de pratiquer une perfusion continue de radiotraceur après le bolus.

C. Justification du choix du temps d'administration de la fenfluramine

Il n'existe pas de données publiées de microdialyse chez le chat avec des mesures cinétiques de sérotonine extracellulaire. Toutefois, les données obtenues chez le rat, le singe et le porc indiquent un relargage de sérotonine transitoire et une hétérogénéité de la réponse selon les régions cérébrales concernées. Au regard des cinétiques décrites dans les trois modèles (Figure 46), il nous est apparu opportun d'injecter la fenfluramine 30 minutes après le début de l'acquisition TEP. En effet le pic de sérotonine par voie iv est atteint environ 15 minutes après son injection. Sur une acquisition de 90 minutes, cela permet 30 minutes d'acquisition avec atteinte de l'équilibre pour estimer la liaison basale du radiotraceur et 60 minutes de challenge pharmacologique comprenant 45 minutes 'post-pic' de sérotonine. Par ailleurs, pour l'étude de prétraitement, un temps supérieur à celui de l'atteinte du pic (ie 15 min) nous semble pertinent pour se placer après le relargage de sérotonine et évaluer son impact sur la liaison du radiotraceur. Nous avons choisi que le temps de 30 minutes entre l'injection de fenfluramine et l'injection du radiotraceur serait suffisant.

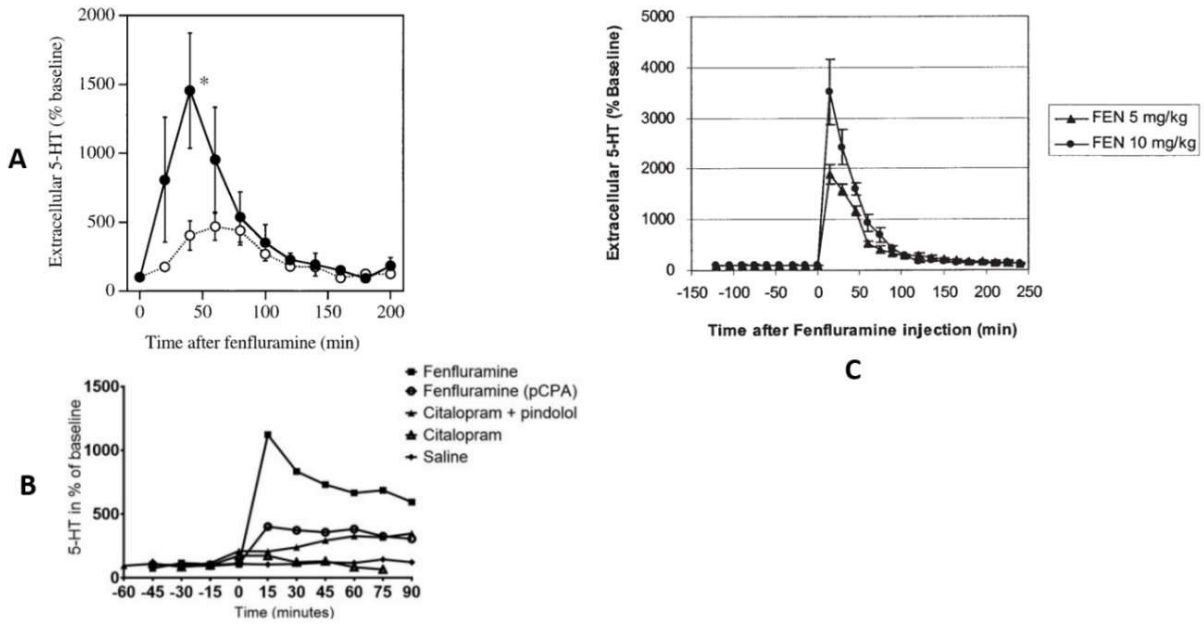


Figure 46 : cinétiques des taux de sérotonine dans le cortex préfrontal -A : chez le rat,10 mg/kg, ip (223) ; B : chez le cochon, 0.5 mg/kg, iv (224) ; C : chez le singe conscient, 5mg/Kg et 10 mg/Kg, iv (225).

D. Justification de la sélection de la dose de fenfluramine

Dans les expériences publiées de challenge pharmacologique et de pré-traitement, les doses s'échelonnent de 0.5 mg/Kg à 10 mg/kg (Tableau 6). Nous avons décidé dans un premier temps de tester une dose de 1 mg/Kg sur le modèle chat. L'analyse de la première expérience de challenge nous a indiqué, des modifications de pentes des courbes temps activités suffisamment importante pour garder cette dose dans les expériences ultérieures. Par ailleurs, les variations de fréquences cardiaques enregistrées pendant l'acquisition semblaient déjà suffisamment significatives pour ne pas augmenter les doses et engendrer une tachycardie voire une arythmie potentiellement délétères sur les chats, modèle animal précieux (Figure 47).

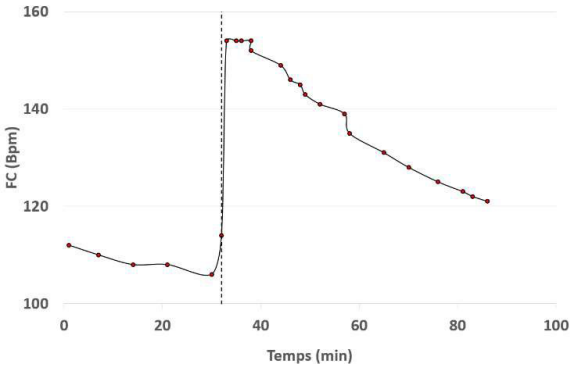


Figure 47 : fréquence cardiaque d'un chat après administration de fenfluramine 1 mg/kg à t=30 min.

II. Discussion

Les études de sensibilité à la sérotonine réalisées avec les radiotraceurs antagonistes 5-HT_{1A} montrent des résultats hétérogènes (Tableau 6). Dans l'étude présentée ici avec le radiotraceur agoniste [^{18}F]F13640, le prétraitement et le challenge pharmacologique avec une dose faible de fenfluramine (1mg/Kg) indiquent une sensibilité à la libération de sérotonine. Bien qu'aucune étude de microdialyse n'ait été pratiquée sur notre modèle félin, le modèle lp-ntPET utilisé discrimine avec succès les courbes temps-activité associées au contrôle et celles associées au challenge pharmacologique. Ces données confirment l'hypothèse initiale que les radiotraceurs agonistes sont plus sensibles à la libération de sérotonine que les antagonistes. Elles encouragent aussi à poursuivre le développement du [^{18}F]F13640. Il convient aussi de continuer à investiguer cette sensibilité à la sérotonine dans d'autres protocoles. Il s'agit notamment de protocole de challenges pharmacologiques à différentes doses de fenfluramine pour confirmer le déplacement dose dépendant montré en autoradiographie ex-vivo (211). Si toutefois les résultats présentés sont

encourageants, nous nous proposons d'évoquer les limites de l'étude réalisée et des questions méthodologiques associées au radiotraceur.

A. Modélisation du [^{18}F]F13640

On note dans un premier temps, qu'il n'existe pas encore de modélisation complète du |^{18}F]F13640. Une modélisation chez le rat avait été tentée selon un modèle triple injection (Figure 48), mais l'élimination lente du radiotraceur a été un facteur limitant pour une acquisition de 90 minutes (226).

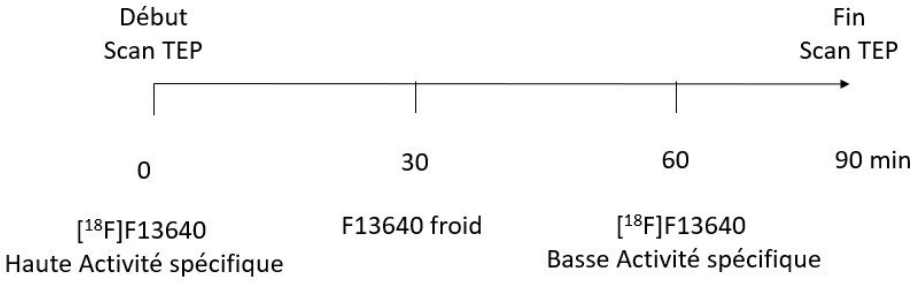


Figure 48 : modèle triple injection appliqué sur le rat pour modélisation du [^{18}F]F13640.

La figure ci-après montre, à titre illustratif, l'aspect des courbes temps activité modélisées (en bleu) et expérimentales (en vert) du |^{18}F]F13640 sur le logiciel pmod ®.

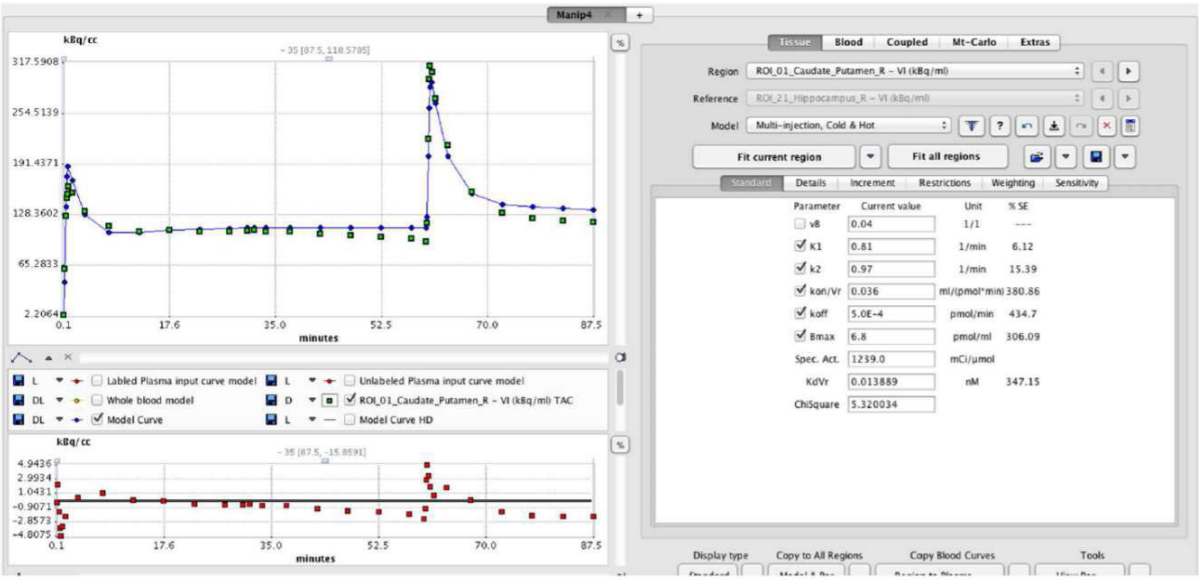


Figure 49 : capture d'écran du logiciel pmod® (données non exploitées). La courbe bleue est la courbe temps activité modélisée du [^{18}F]F13640 dans la région Caudé Putamen. Les points verts sont les points expérimentaux.

On remarque que la cinétique du radiotraceur n'est pas assez dynamique sur 90 minutes et par conséquent, la modélisation est peu efficace puisqu'elle ne capte pas 5 points expérimentaux sur la figure. Ces limites se traduisent par une estimation de densité de récepteurs non cohérente (226). Une tentative de modélisation sur un modèle mono-injection a été effectuée sur un modèle primate. Toutefois, les prélèvements artériels présentaient des données manquantes, l'expérience était réalisée sur un seul animal et aucune région de référence n'avait été identifiée. L'équipe de recherche a renoncé à la pose d'un cathéter artériel chez le chat, geste technique risqué et non systématiquement reproductible chez les quatre chats du laboratoire utilisés. De plus, il a été choisi de ne pas réaliser de protocole de modélisation du radiotraceur avec prélèvement d'échantillons artériels sur le modèle chat du fait de l'étude à venir chez l'homme avec son protocole complet permettant une modélisation exhaustive.

B. Conséquences sur l'analyse de la sensibilité du [^{18}F]F13640 à la sérotonine

Tel que décrit dans toutes les études TEP précédentes , la quantification du [^{18}F]F13640 s'est faite par la mesure simplifiée d'un ratio de SUV dans chaque région, normalisée par les SUV d'une région de référence (227). Ce ratio de liaison spécifique présente une faiblesse méthodologique parce que la corrélation entre ces mesures simplifiées avec région de référence ne sont pas validées par les macro-paramètres déterminés (B_{max}) selon une modélisation complète avec prélèvements artériels (228). Par conséquent, l'ensemble des calculs d'occupation réalisés dans cette étude ne sont pas exempts de limites méthodologiques : les indices de liaison du [^{18}F]F13640 sont issus d'une méthode simplifiée non validée par un modèle exhaustif. Comme vu plus haut, la fenfluramine induit des changements de flux cérébral dans diverses régions notamment cortex frontal et cingulaire. On peut toujours se demander si les modifications du [^{18}F]F13640 enregistrées dans le challenge pharmacologique sont dues au déplacement du radiotraceur dans le compartiment de liaison spécifique ou à l'effet de chasse du radiotraceur dans le compartiment de liaison libre par augmentation du flux sanguin cérébral. A titre d'exemple, Udo de Haes et col montrent chez le rat que la fenfluramine exerce une diminution de la liaison du radiotraceur antagoniste, le [^{18}F]MPPF, alors qu'une combinaison de citalopram et de kétansérine n'a aucun impact. Ces observations n'excluent pas un effet de chasse provoqué par le fenfluramine (225). Si les résultats du prétraitement à la fenfluramine sont en faveur d'un déplacement spécifique du [^{18}F]F13640, l'incertitude est patente. En l'absence de modélisation fiable, on peut penser que le radiotraceur se distribue majoritairement dans le compartiment non spécifique et que les modifications observées sous fenfluramine sont le reflet de changements de perfusion des tissus. Ces hypothèses de

déplacement non spécifique sont à contrebalancer avec les données d'autoradiographie *in vitro* du radiotraceur qui indiquent une liaison spécifique, sélective vérifiée sur plus d'une trentaine de récepteurs (199), bloquée par la sérotonine et l'antagoniste WAY-100635 (211). Les données TEP indiquent aussi un blocage par le WAY-100635 et l'agoniste 8-OHDPAT sur des modèles de rat, chat et primate (211).

C. Impact de la cinétique du radiotraceur sur les mesures

On notera aussi que la constante de dissociation du [^{18}F]F13640 et sa cinétique d'élimination sont très lentes. Ces éléments permettent de s'affranchir d'un protocole de perfusion continue considéré comme optimal dans les challenges pharmacologiques (222). Toutefois, l'acquisition de 90 minutes pratiquée ici semble insuffisante pour assurer une quantification faible du déplacement du radiotraceur en identifiant une zone d'équilibre. On notera que la réalisation d'expériences sur le modèle chat nécessite l'anesthésie de l'animal. La durée de 90 minutes semblait adéquate pour éviter de mettre en jeu le pronostic vital (lié à l'anesthésie par isoflurane) des animaux pendant les expériences. Ces acquisitions courtes sont donc expliquées par les limitations imposées par le modèle chat lui-même.

D. Discordances des observations *in vitro* et *in vivo*

Les données observées dans cette étude mettent en évidence des discordances. Premièrement, il faut noter qu'en autoradiographie le [^{18}F]F13640 ne présente pas de liaison marquée dans le cervelet, et cette dernière n'est pas influencée par un agent découplant ou l'ajout de concentrations croissantes de sérotonine (211). *In vivo*, on remarque une liaison corticale déplacée par la fenfluramine lors du challenge pharmacologique et en pré-traitement. Ceci indique l'existence de récepteurs couplés au niveau cortical. Une hypothèse évoquée pour expliquer ce paradoxe pourrait être la structure anatomique du cervelet en feuillets successifs de matière blanche et de matière grise (229,230) qui constituerait un obstacle pour la fixation du radiotraceur *in vitro*. Si l'on se réfère aussi aux données du [^{18}F]MPPF et du [^{11}C]WAY100635, elles n'indiquent aucune liaison *in vitro* et *in vivo* dans le cervelet (223,231). Ce dernier est considéré comme région de référence pour la quantification des indices de liaison du [^{18}F]MPPF (231). Par conséquent, cela indique qu'il n'y aurait pas de récepteurs 5-HT$_{1A}$ dans le cervelet ou une très faible proportion de récepteurs couplés mis en évidence uniquement par le [^{18}F]F13640. Cette hypothèse conforte les données de la littérature qui indiquent l'existence de projections sérotoninergiques dans le cervelet (232,233) et l'existence de fonctions médiées par les récepteurs 5-HT$_{1A}$ au niveau du cervelet (230). Toutefois, la localisation

immunohistochimique des récepteurs 5-HT_{1A} par anticorps n'indique qu'un faible signal dans le cervelet (234). Il existe donc des zones d'ombres pour décrypter cette liaison dans le cervelet.

E. Apport de l'imagerie TEP différentielle agoniste/antagoniste

On note aussi des grandes disparités de liaison des agoniste-antagoniste radiotraceurs chez le chat (Figure 50). Les données chez le chat du [^{18}F]MPPF indiquent l'existence de récepteurs 5-HT_{1A} découplés et non déplaçables par la sérotonine et une faible proportion de récepteurs couplés chez le rat et le singe conscient et dans un paradigme bolus-perfusion(225,235). Les images obtenues avec le [^{18}F]F13640 signent l'existence de récepteurs 5-HT_{1A} couplés répartis de façon ubiquitaire dans le cerveau. L'étude mettant en évidence une liaison déplaçable par la sérotonine conforte cette hypothèse. On comprend ici l'intérêt de comparer l'imagerie agoniste/antagoniste évoquée précédemment. Il est possible d'émettre des hypothèses sur la répartition fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{1A}.

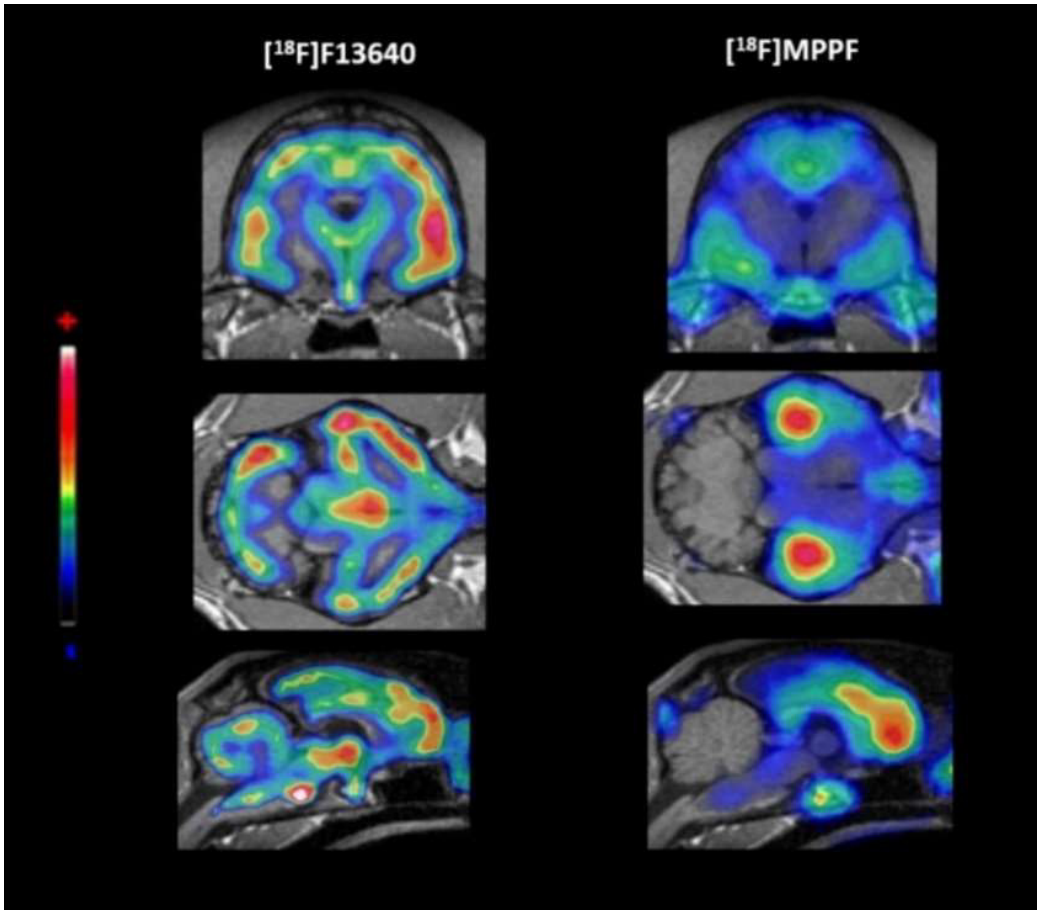


Figure 50 : imagerie TEP comparative du [^{18}F]F13640 et du [^{18}F]MPPF chez le chat.

III. Conclusion

L'étude présentée est en faveur de la sensibilité du [^{18}F]F13640 à la libération de sérotonine. Le statut agoniste semble donc être favorable à un un ligand compétitif avec un neurotransmetteur endogène. Les autres études de prétraitement et de challenge pharmacologique avec les radiotraceurs antagonistes 5-HT$_{1A}$ présentent des résultats peu encourageants. On comprend ainsi l'intérêt du radiotraceur agoniste TEP devant son analogue antagoniste. Cela ne doit pas faire oublier les limites de l'étude présentée qui doit inviter à générer de nouvelles expériences pour confirmer la spécificité et la sélectivité de la liaison du [^{18}F]F13640 ainsi que se sensibilité au relargage de sérotonine. Parmi les études que l'on pourrait proposer, on retient notamment l'utilisation de souris KO 5-HT$_{1A}$ selon le même protocole que le [^{18}F]MPPF (236) pour confirmer sa spécificité, la réalisation d'un challenge pharmacologique avec un autre agent que la fenfluramine pour s'assurer que le déplacement du radiotraceur est bien attribuable au relargage de sérotonine et non à un effet de chasse. Sur le plan méthodologique, on identifie le besoin d'une modélisation pharmacocinétique du radiotraceur avec validation d'une méthode simplifiée estimant un volume de distribution dans le compartiment de liaison spécifique. En préclinique, le modèle porc semble être une alternative au modèle chat qui présente de nombreuses contraintes et notamment l'impossibilité de réaliser des prélèvements artériels. Il conviendrait aussi de tester le [^{18}F]F13640 dans des paradigmes de déplétion. Ces éléments paraissent indispensables pour s'affranchir des biais de confusion évoqués dans les chapitres précédents (89). Enfin, la réalisation d'acquisition TEP plus longue est requise étant donné l'élimination lente du [^{18}F]F13640.

Radiotraceur	Kd (nM)	Défi pharmacologique/Prétraitement/Déplétion	Espèces	Effectif	Critère de jugement	Résultat	Région	Références
[^{11}C]WAY-100635	2	Fenfluramine 10 mg/Kg ip 30 min avant t_0 scan TEP	Rat	6+6	BP_{SRTM} Ratio VOI/Cervelet	↘20% BP ↘10% VOI	Hippocampe	(223)
		Fenfluramine 10 mg/Kg iv 20 min après t_0 scan TEP	Rat	3	$BP_2/BP1= (1+F1/K_i)/(1+F2/K_i)$	BP2/BP1=0,93	Hippocampe	(237)
		Déplétion en Tryptophane Perfusion de Tryptophane 100 mg/Kg 30 min avant t_0 scan TEP	Homme	4+4	BP_{SRTM}	**NS**	NA	(238)
[^{18}F]MPPF	0,34	N=2; Fluoxétine 5 mg/kg , 30 min avant t_0 scan TEP N=1; Fluoxétine 5 mg/kg 1 fois/J pendant 21 jours en SC	Chat	3	BP_{SRTM}	↘34% En aigüe	Noyau Dorsal du Raphé	(239)
		Fluoxétine 20 mg 5h avant t_0 scan TEP vs placebo + test-retest	Homme	8	BP_{SRTM}	↘ 44%+/-22	Noyau Dorsal du Raphé	(240)
		Dose Aigüe : Citalopram i.p 0.5 mg/kg 60 min après t_0 Dose Chronique: Citalopram 10 mg/kg/J par pompe osmolaire 21 jours Injection de pargyline 3h avant t_0 injection pour les 2 groupes	Rat	23+5	BP_{SRTM}	**NS**	NA	(236)
		Condition 1 : Régime de 24 h déplété en tryptophane. Boisson déplétée 4.5 heures avant t_0 scan TEP Condition 2 : Perfusion de tryptophane (10 mg/ml), 50 mg/kg, pendant 30 min, 60 min avant t_0 scan TEP	Homme	6	BP_{SRTM}	**NS**	NA	(241)
		Paradigme Bolus Perfusion sans anesthésie Fenfluramine 5 mg/kg or 10 mg/kg i.v entre 90 et 130 minutes après le t_0 scan TEP Fenfluramine 10 mg/Kg ip	Singe	3	BP_{SRTM}	**NS**	NA	(235)
[^{18}F]FPWAY	<10	Paradigme Bolus Perfusion Paroxétine 5 mg/kg, i.v. pendant 15 min, à 90 min après t_0 scan TEP	Singe	4	$BP_1=(C_{ROI} - C_{Cervelet})/C_{Plasma}$ $BP_2= (C_{ROI}-C_{Cervelet})/C_{Cervelet}$	↘-27% ↗	Noyau Dorsal du Raphé Cortex cérébral	(242)
[^{11}C]CUMI-101	0,15	Citalopram 2 et 4 mg/kg i.v., 30 min avant t_0 scan TEP Fenfluramine 2.5 mg/kg i.v., 30 min avant t_0 scan TEP	Singe	3+3	OC plot−VT	↘15 % à↘30 % ↘24 %	Régions cérébrales diverses	(131)
		Citalopram 10 mg i.v., 45 min avant t_0 scan TEP vs. Placebo	Homme	N=13	OC plot−VT BPND	↗14 % ↗5–8 %	Régions cérébrales diverses	(243)
		Citalopram 0.15 mg/kg i.v., 30 min avant à 30 min après t_0 scan TEP	Homme	N=6	VT BP_{ND}	**NS**	NA	(132)

Tableau 6: recensement non exhaustif d'études TEP majeures abordant la sensibilité des radiotraceurs antagonistes 5-HT_{1A} à la libération de sérotonine.

IV. Article

[^{18}F]F13640, a 5-HT$_{1A}$ receptor radiopharmaceutical sensitive to brain serotonin fluctuations

Matthieu COLOM[1,2], Benjamin VIDAL[1], Sylvain Fieux[1] , Jérôme Redoute[3], Nicolas COSTES[3], Franck LAVENNE[3], Inés MÉRIDA[3], Zacharie IRACE[3], Thibaud IECKER[3],Caroline BOUILLOT[3], Thierry BILLARD[3], Adrian NEWMAN-TANCREDI[5], Luc ZIMMER[1,2,3,4]

1. Université de Lyon, Lyon Neuroscience Research Center, INSERM, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
2. Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
3. CERMEP-Imagerie du Vivant, Bron, France
4. Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France.
5. Neurolixis, Castres, France

Corresponding Author: Luc Zimmer
Address: CERMEP, Groupement Hospitalier Est, 59 Boulevard Pinel, F-69677 Bron, France.
E-mail: luc.zimmer@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Purpose Serotonin is involved in a variety of physiological functions and brain disorders. In this context, efforts have been made to investigate the in vivo fluctuations of this neurotransmitter using positron emission tomography (PET) imaging paradigms. Since serotonin is a full agonist, it binds preferentially to G-protein coupled receptors. In contrast, antagonist PET ligands additionally interact with uncoupled receptors,. This could explain the lack of sensitivity to serotonin fluctuations of current 5-HT_{1A} radiopharmaceuticals which are mainly antagonists and suggests that agonist radiotracers would be more appropriate to measure changes in neurotransmitter release. The present study evaluated the sensitivity to endogenous serotonin release of a recently-developed, selective 5-HT_{1A} receptor PET radiopharmaceutical, the agonist [^{18}F]F13640.

Materials and methods Four cats each underwent three PET scans with [^{18}F]F13640, ie, a control PET scan of 90 min, a PET scan preceded 30 min before by an intravenous injection 1 mg/kg of d-fenfluramine, a serotonin releaser (blocking challenge), and a PET scan comprising the intravenous injection of 1 mg/kg of d-fenfluramine 30 min after the radiotracer injection (displacement challenge). Data were analyzed with regions of interest and voxel-based approaches. A lp-ntPET model approach was implemented to determine the dynamic of serotonin release during the challenge study.

Results D-fenfluramine pretreatment elicited a massive blockade of [^{18}F]F13640 labelling in regions known to express 5-HT_{1A} receptors, e.g., raphe nuclei, hippocampus, thalamus, anterior cingulate cortex, caudate putamen, occipital, frontal and parietal cortices and grey matter of cerebellum. Administration of d-fenfluramine during PET acquisition indicates changes in occupancy from 10 % (thalamus) to 31% (grey matter of cerebellum) even though [^{18}F]F13640 dissociation constant from the receptor was low for a 90 min acquisition time. The lp-ntPET simulation succeeded in differentiating the control and challenge conditions.

Conclusions The present findings demonstrate that labelling of 5-HT_{1A} receptors with [^{18}F]F13640 is sensitive to serotonin concentration fluctuations in vivo. Although the data underline the need to perform longer PET scan to ensure accurate measure of displacement, they support clinical development of [^{18}F]F13640 as a tool to explore experimental paradigms involving physiological or pathological (neurological or neuropsychiatric pathologies) fluctuations of extracellular serotonin.

INTRODUCTION

The 5-HT_{1A} receptor is a subtype of serotonin (5-HT) receptors that belongs to the G-protein coupled receptor family. 5-HT_{1A} receptors couple to $G_{i/o}$ protein and their activation induces an inhibition of cyclase adenylate and a decrease of cAMP synthesis, leading to hyperpolarization of neuron membrane and inhibition of neuron activity (244). 5-HT_{1A} receptors are widely distributed in the central nervous system, being localized in raphe nuclei as somatodendritic receptors (245), or in cortical and limbic areas as post-synaptic receptors (246–248). The wide regional expression of 5-HT_{1A} receptors is in accordance with their involvement in many physiological functions, including cognition (249), cognitive behaviors (249), pain (250) and in numerous brain disorders such as anxiety (251), depression (252), schizophrenia (253), Alzheimer disease (214) and Parkinson disease (254). In view of the complexity of the functions controlled by 5-HT_{1A} receptors, efforts have been made to investigate them using various positron emission tomography (PET) imaging tools, notably as concerns the fluctuations of endogenous neurotransmitter levels in physiological or pathological conditions. This objective can be pursued by using radiotracers that bind to the target receptors with comparable affinity as the neurotransmitter of interest. Such an approach has been largely applied to the study of the dopaminergic system, using radiotracers of D_2/D_3 receptors such as [^{11}C]raclopride (89). Unfortunately, measuring endogenous 5-HT release using PET has proved more challenging (217,255). Currently, very few radiotracers display sensitivity to changes in 5-HT levels, including [^{11}C]Cimbi-36, a 5-HT_{2A} receptor agonist radioligand (256) and [^{11}C]AZ10419369, a 5-HT_{1B} receptor agonist radioligand (257). As concerns 5-HT_{1A} receptors, some studies were carried out in rodent models with the antagonist [^{18}F]MPPF (258,259) but did not show sufficient sensitivity to robustly evaluate physiological changes of endogenous serotonin levels,

The main reason cited for the lack of sensitivity of 5-HT_{1A} radiopharmaceuticals is the fact that they are antagonists or, at best, partial agonists (90). In vitro studies indicate that antagonist ligands bind similarly to receptors in both coupled and uncoupled states (89). Since serotonin is a full agonist which binds preferentially to G-protein-coupled receptors, competition with a PET antagonist is therefore "diluted" by the latter's additional interaction with uncoupled receptors. In this context, using agonist radiotracers seems a more promising strategy, as they directly compete with endogenous serotonin on the same G-protein-coupled sites. Accordingly, [^{11}C]Cimbi-36 shows a higher sensitivity to serotonin fluctuations compared to the antagonist radiotracer, [^{18}F]altanserin (260).

We previously evaluated a series of full-agonist ligands of 5-HT_{1A} receptors, F13714, F15599 (a.k.a. NLX-101) and F13640 (a.k.a. befiradol or NLX-112), as potential radiotracers. Although the labelling of

F13714 and F15599 with fluorine-18 was successful, their first use in vivo as radiotracers showed that the signal to noise ratio was too low for [^{18}F]F15599, and that [^{18}F]F13714 binding appeared to be irreversible (139,195). In contrast, [^{18}F]F13640 showed satisfying properties for neuroimaging. PET studies in rats, cats and non-human primates revealed that it specifically targets 5-HT_{1A} receptors, and showed a good signal to noise ratio (261). Moreover, *ex vivo* autoradiography studies in rat showed that [^{18}F]F13640 was almost ten times more sensitive to competition binding with serotonin than the antagonist [^{18}F]MPPF (261), thus justifying the current study.

The aim of the present PET study was therefore to further investigate the PET sensitivity of [^{18}F]F13640 to changes in endogenous serotonin levels induced by 1 mg/kg of d-fenfluramine, a serotonin releaser. Studies were conducted in cat due to its higher imaging resolution than mice and rats (239), as shown in our previous experiments with [^{18}F]F13640 (261,262). We performed two type of pharmacological PET protocols with [^{18}F]F13640: (i) a d-fenfluramine pretreatment 30 minutes before PET acquisition (5-HT blocking paradigm); and (ii) a challenge of d-fenfluramine 30 minutes after start of PET acquisition (5-HT displacement paradigm). Additional in vitro autoradiography experiments were also carried out and the data were analyzed using a ROI-based and a voxel-based approaches, with simple estimations of 5-HT_{1A} receptors occupancy by serotonin or kinetic modeling of serotonin release using the lp-ntPET protocol (263).

MATERIAL AND METHODS

I. [^{18}F]F13640 radiosynthesis

Synthesis of [^{18}F]F13640 and quality controls pathways were previously described (261). Briefly, after production of fluoride preparation ^{18}O(p,n)^{18}F cyclotron reaction, 5 mg of F13640 nitro precursor are introduced. After nucleophile substitution, [^{18}F]F13640 is obtained by separation on a preparative HPLC column (SymmetryPrepC18, 7µm, 7.80*300 mm, Waters). The radiotracer is formulated *via* solid phase extraction techniques using a Sep-Pak Light C18 cartridge (Waters). The final product is eluted with 1 mL of ethanol, diluted with saline and finally sterilized by filtration (sterile filter Millex-GS, 0.22 µm; Millipore).

II. Autoradiography studies

The brain of one cat was extracted after euthanasia obtained by short inhalation of isoflurane and in accordance with European guidelines for care of laboratory animals (2010:63:EU). The brain was

immediately frozen in 2-methylbutane cooled with dry ice (-29°C). Coronal sections (30 µm thick) were cut using a -20°C cryostat, thaw-mounted on glass slides, and allowed to air dry before storage at -80°C until used. At the day of the experiment, all slides were incubated for 20 min in Tris phosphate-buffered saline buffer, pH 7.5, containing 37 kBq/ml of [^{18}F]F13640. For competition studies, slices were placed in the same buffer plus four different concentrations of serotonin (1nM, 2nM, 5nM, 10nM). For coupling studies, 10 µM of Gpp(NH)p, a non-hydrolysable analogue of guanosine 5'-triphosphate, was added. After incubation, slides were dipped in distilled cold water (4°C) and then dried and juxtaposed to a phosphor imaging plate and scanned for 60 min (BAS-1800 II; Fujifilm). Regions of interest (ROIs) were manually drawn using Multigauge software (Fujifilm). The results were expressed in optical densities (PSL/mm^2).

III. PET studies

A. Animals and procedures

Four male cats (Isoquimen S.L., Barcelona, Spain) weighting 3.5-5.5 kg underwent PET scans in 12 separate sessions. All experiments were performed in accordance with European guidelines for care of laboratory animals (2010:63:EU). Before each exam, cats underwent a premedication with medetomidine (30-60 µg/kg subcutaneous) followed by anesthesia induction using intramuscular injection of 30 µg/kg medetomidine plus 2 mg/kg ketamine. Radiotracer injection was ensured by a catheter insertion into the cephalic vein of the forearm continuously perfused by NaCl 9%. Endotracheal intubation was performed to ensure a respiration rate of 15 breaths/min and anesthesia was maintained by constant insufflation of 2% isoflurane. Heart rate and SpO2 were continuously monitored. Cats were placed in ventral decubitus in an acrylic stereotactic apparatus with ear bars. Body temperature was maintained using a heated water blanket.

B. Study design

Each cat underwent three PET acquisitions, i.e., one control acquisition, one d-fenfluramine pretreatment acquisition, and one challenge acquisition consisting in d-fenfluramine injected during acquisition. The agonist radiotracer of 5-HT$_{1A}$ receptors [^{18}F]F13640 was injected in a bolus at the start of the PET acquisition over 30 s (108+/-19 MBq), diluted in 1 mL of NaCl 0.9%). D-fenfluramine was administered at 1 mg/kg diluted in 1 mL of NaCl 0.9%, 30 min before PET acquisition, for the pre-treatment study, and 30 min after radiotracer injection, for the pharmacological challenge. The corresponding control experiments consisted in a 1 mL saline administration 30 min after the radiotracer injection.

C. Data acquisition and reconstruction

Images were acquired on a PET/CT Biograph mCT (Siemens) at the CERMEP-imaging platform. Before PET emission scan, a rapid CT acquisition was performed to compute a brain attenuation map. The PET emission scan was performed for 90 min in list mode immediately after intravenously injection of [^{18}F]F13640. A dynamic PET image was reconstructed in a series of 28 sequential frames(4*30s;4*60s;8*180s and 12*300s). PET images were reconstructed with a fully three-dimensional (3D) ordinary Poisson OSEM reconstruction (OP-OSEM). PET data were preprocessed using MINC Toolkit (Mc Connell Brain Imaging Centre, Montreal) and modeled with programs of the Turku PET Center library. For each cat, a PET sum image was computed and used as target for the warping of a multi-subject MRI template (264), which allows the parcellation of the brain into 20 anatomical brain regions of interest. In addition, a bisymmetrical anterior part of centrum semiovale was manually drawn on display software and was considered as a reference region. Time-activity curves in kBq/cc were extracted for each ROI, bilaterally averaged. Each time point of the TAC was converted into binding ratios compared to the centrum semiovale, which was chosen as region of reference.

IV. PET data analysis

A. Occupancy analysis in pretreatment and challenge studies

In pretreatment experiments, averaged binding ratios between 40 and 88 min were compared with the control experiments by Student t tests ($p<0.01$, Graphpad Prism 6). In the pretreatment study, blocking rates in the frame [40;88] min were calculated as below:

$$Blocking\ rate\ (\%) = \frac{Ratio\ (Control) - Ratio(Pre - treatment)}{Ratio(Control) - 1} \times 100$$

In the pharmacological challenge experiments, binding ratios between 40 and 88 min were compared with binding ratios to estimate occupancy rates (227):

$$Occupancy\ (\%) = \frac{Ratio\ (Baseline) - \ Ratio(Post\ injection)}{Ratio(Baseline) - 1} \times 100$$

The occupancy values obtained for each scan were averaged and compared to the control condition by Student t tests ($p<0.01$, Graphpad Prism 6). The occupancy rates in challenge condition were subtracted with the occupancy rates calculated in the control condition to finally obtain a corrected occupancy rates, taking into account non-specific changes that could occur without any challenge

B. Voxel-based analysis of the pharmacological challenge study

Ratio images were generated by dividing the PET signal in each voxel by the mean signal in the centrum semiovale using the Turku PET Center software (*Imgratio* function) to generate one baseline image from 15 to 30 min, one global post injection image from 30 to 90 min and 6 post injection images corresponding to 10-min intervals of 30-40 min; 40-50 min; 50-60 min; 60-70 min; 70-80 min; 80-90 min. These ratio images were smoothed using a 1*1*1 mm^3 isotropic Gaussian filter, spatially normalized in the template space, and statistically analyzed with SPM 12. Pooling the 4 subjects, a statistical map of the significant decreases of [^{18}F]F13640 binding after the pharmacological challenge was computed with two successive paired t-test, the first performed for each scan using the relative contrast (Baseline image – Post injection), the second to compare the saline and challenge conditions, corresponding to the final contrast [(Baseline image – Post injection)$_{challenge}$ – (Baseline image – Post injection)$_{saline}$] for each post-injection time interval. Statistical significance was set at $p<0.01$ uncorrected.

C. Kinetic modelling of [^{18}F]F13640 displacement in the pharmacological challenge study

We applied the lp-ntPET model (263) optimized with the 2-step method (265) on control and challenge conditions in order to characterize the transient tracer displacement induced by an endogenous serotonin release. This model computes the perfusion ratio of the ROI relative to the reference region (R1), the efflux rate in the reference region (k_2) and in the ROI (k_{2a}), as well as four parameters describing the analytical curve of the endogenous serotonin discharge (modeled as a gamma variate function) underlying the TAC curve decrease after pharmacological challenge. The discharge equation parameters are , start time of the discharge (t_D), time of the peak of the discharge (t_P), a parameter controlling the shape of the discharge (α), and the amplitude of the discharge (γ). The following constraints were applied on parameters: t_D was searched between 30 to 50 min with a step of 1 min, t_P was searched between 31 and 90 min with a step of 1 min, and α ranged from 0.5 to 10 with a step of 0.5.

Curves of k_{2a} variation across time (expressed as the % of baseline) were calculated to highlight dynamic changes in regional 5-HT receptors (266). Receptor occupancies were obtained, in each region, from the dynamic BP_{ND} (DBP_{ND}) (267) estimated with the 2-step lp-ntPET model.

$$Occupancy\ lp-ntPET\ (\%) = \frac{DBP_{ND}(Baseline) - DBP_{ND}\ (Post\ injection)}{DBP_{ND}(Baseline)} \times 100$$

Where DBP_{ND} (baseline) is the averaged DBP_{ND} on the interval 30-40 min and DBP_{ND} (post injection) is the averaged DBP_{ND} on the interval 40-90 min.

RESULTS

I. Radiosynthesis

Radiolabelling of the nitro-precursor with fluorine achieved a radiochemical yield of 6% corrected for decay and 90 min-radiosynthesis time. The synthesis led to no other radioactive derivatives and the chosen HPLC conditions ensured good separation of [^{18}F]F13640 from its precursor (261). Radiochemical purity was higher than 98%, and specific activity at EOS ranged between 25 and 124 GBq/µmol. Radioactivity injected ranged from 76 MBq to 137 MBq.

II. In vitro studies

In vitro sensitivity of [^{18}F]F13640 was evaluated by incubation of cat brain slices with increasing concentrations of serotonin in buffer. Binding was decreased in a concentration-dependent manner especially for the cingulate cortex (52% inhibition at 10 nM), the frontal cortex (32% at 10 nM) and the lateral septum (48% at 10 nM) (Figure 1A). No changes were observed in the cerebellum. Incubation of cat brain slices with 10 µM of Gpp(NH)p, a receptor/G-protein uncoupling agent, induced significant reduction of [^{18}F]F13640 binding in comparison with control experiment: 52 % in the cingulate cortex, 48 % in the frontal cortex, 50% in lateral septum and no changes in the cerebellum (Figure 1B).

III. In vivo distribution of [^{18}F]F13640

[^{18}F]F13640 kinetics showed rapid uptake in the whole cat brain, and a slow wash-out during the 90 minutes of acquisition (Figures 2 and 3). The dorsal raphe nucleus (DRN), the anterior cingulate cortex, the hippocampus and the thalamus showed the higher uptake values. The cortical parts of the cerebellum showed an intermediate uptake unlike the cerebellar nuclei. We also identified the anterior part of centrum semiovale as a region displaying a very low uptake for (Figure 2). Given that this region was unlikely to be impacted by partial volume effects compared to the cerebellar nuclei (due to their proximity with the cortical parts displaying high uptake) and that the signal was low and constant in the three conditions (Figure 3), this region was chosen as a reliable reference region.

IV. Pretreatment study with d-fenfluramine

The intravenous administration of d-fenfluramine (1mg/kg) 30 min before radiotracer injection induced a drastic decrease of [^{18}F]F13640 uptake (Figure 2). Significant decreases of binding ratios control occurred in caudate, thalamus, hippocampus, anterior cingulate cortex, frontal cortex, parietal cortex and DRN. The average blocking rate varied between 96 % (grey matter of the cerebellum) and 33% (pontine nuclei) (Table 1).

V. Challenge study with d-fenfluramine

The intravenous injection of d-fenfluramine (1mg/kg), 30 min after radiotracer injection, slightly decreased the time activity curves/increased the wash-out rate of [^{18}F]F13640. The impact of d-fenfluramine on TAC slope started at 40 minutes (Figure 3). Significant changes in occupancy rate were observed in cerebellum, hippocampus, caudate, occipital cortex, parietal cortex and thalamus. The average corrected rate of occupancy ranged from 14% for the frontal cortex to 31 % for the cerebellum (Figure 4). The voxel analysis underlined a progressive effect of the competition between the radiotracer and 5-HT induced by d-fenfluramine. Regions statistically concerned by this effect ($p<0.01$) were rostral colliculus, cerebellar grey matter, raphe nuclei, marginal gyrus, precuneus, cingulate gyrus, and lateral septum (Figure 5).

VI. Kinetic modelling with 2-step lp-ntPET

Occupancy rates estimated using the 2-step lp-ntPET model displayed high displacement of the tracer in cerebellum, hippocampus, and the cingulate, frontal, temporal and occipital cortices, ranging from 12% in caudate to 16% in cerebellum (Figure 4). Interestingly, the curves of estimated parameter k2a displayed slight differences among animals and regions of interest. For cat 1, the shape of the curve was similar for all regions, with the detected start time of discharge at 15 minutes and a peak at 45-50 minutes after d-fenfluramine administration. The cat 2 displayed similar curves with a lower peak amplitude. For cat 3 the curves were slightly different, with a start time occurring later, at around 20 minutes, and a peak at 50 minutes after d-fenfluramine administration in the anterior cingulate cortex, cerebellum and caudate. In the hippocampus, the curve was even sharper with a start time at 25 minutes and a peak at 45 minutes after the challenge. For cat 4, two different kinetics were observed. In the cerebellum and the anterior cingulate cortex, the start time occurred very early, just after d-fenfluramine administration, followed by a slow increase to a peak reached between 45 and 50 minutes. In the caudate and the hippocampus, the start time was about 10

minutes after the challenge and k2a values increased rapidly, reaching a plateau 30 minutes after the challenge. We also noticed variations in terms of peak amplitude among regions (anterior cingulate cortex: cat4 > cat1 > cat2 > cat3 ; caudate: cat1 > cat4 > cat3 > cat2 ; cerebellum: cat1 > cat4 > cat2 > cat3 ; hippocampus: cat3 > cat1 > cat4 > cat2) and among cats (cat1: cerebellum > caudate > anterior cingulate cortex > hippocampus; cat2 and cat4: cerebellum > anterior cingulate cortex > caudate > hippocampus ; cat3: hippocampus > cerebellum > caudate > anterior cingulate cortex). The amplitude of peak ranged from 110% to 140% of k2a basal values (Figure 6)

DISCUSSION

In certain controlled paradigms, PET imaging enables the in vivo measure of neurotransmitter fluctuations in the living brain. For example, the determination of changes in extracellular dopamine levels elicited by dopamine-releasers has been well described, but equivalent exploration of the serotonin neurotransmission has proven to be difficult (89,90,217,255–259). Several teams have attempted to identify and characterize serotoninergic radiotracers that are sufficiently sensitive to detect changes in endogenous serotonin concentrations following an acute pharmacological challenge, but with limited success. Recently, an European consortium of teams demonstrated that [^{11}C]CIMBI-36 binding is sensitive to increased levels of brain serotonin release following a d-amphetamine challenge (268). In the present preclinical study, we propose an alternative radiopharmaceutical with a number of advantages. On the one hand, [^{18}F]F13640 binds widely to 5-HT_{1A} receptors in the brain and covers many brain regions in both animals (261) and, as recently shown, in humans (269). On the other hand, this radiopharmaceutical is radiolabelled with fluorine 18, allowing prolonged experimental protocols as well as broader dissemination to other research sites.

As previously mentioned, the pharmacological characteristics of F13640 (a highly specific 5-HT_{1A} receptor agonist, aka NLX-112 or befiradol) and preliminary in vitro results prompted us to initiate this preclinical proof-of-concept study.

I. Effect of d-fenfluramine on brain serotonin levels

The choice of d-fenfluramine, a well-described 5-HT releaser, was justified by its very low affinity for 5-HT_{1A} receptors (K_i=831 nM), ruling out the possibility of a direct competition with [^{18}F]F13640 at administered doses (33). Although the binding profile of d-fenfluramine is well-known, there is a lack of data concerning effects of d-fenfluramine in different brain regions in terms of 5-HT release in cat. One study reported that basal serotonin concentrations in dorsal raphe of cats ranged from 0.32 nM

during REM sleep to 0.8 nM during waking (270). In the anesthetized rat, previous data indicated basal levels of serotonin of 0.24-0.25 nM in the ventral hippocampus (271). The intraperitoneal injection of 10 mg/kg of d-fenfluramine increased 5-HT levels to a maximum of about 7 nM (that is, nearly 3000% of baseline levels) after 40 min. In rat striatum, basal levels of serotonin were reported at 0.11 nM, with 1 mg/kg of d-fenfluramine ip increasing the concentration to 282% of basal levels after 2 hours in conscious animals (272). Basal levels in frontal cortex were estimated at 1.2 nM and administration of 10 mg/kg d-fenfluramine induced an increase to 420% of the baseline 30 minutes after ip injection (273). Hume and colleague reported that, after 40 min, d-fenfluramine 10 mg/kg ip increased 5-HT levels 4.5 fold in frontal cortex and 15 fold in for hippocampus (274). In pig, a d-fenfluramine dose of 0.5 mg/kg induced an increase of 1123% of serotonin in medial prefrontal cortex, 15 min after intravenous injection (260). These results and others show heterogenous basal levels of serotonin among brain regions and a widespread effect of d-fenfluramine, with some variability depending on the regions and species considered. A major limitation of many of these microdialysis studies is that high doses of d-fenfluramine can lead to large increases in extracellular serotonin concentrations that may not reflect normal-physiological conditions. In view of these multiple experimental results, the present study therefore used a low dose of fenfluramine in order to mimic physiological levels of serotonin fluctuation.

II. Effect of d-fenfluramine on PET radiotracers binding

Measuring endogenous levels of serotonin by competition with a PET radiotracer is a real challenge and no 5-HT_{1A} receptor radiotracer has previously been successfully used for this purpose. The development of such a radiotracer faces many challenges related to both its own kinetic properties and to the characteristics of the serotonin system (255). For instance, the in vivo density of 5-HT_{1A} receptors in the high affinity (i.e. G-protein-coupled) state is considered to be low, as suggested by in vitro findings, which may explain the lack of sensitivity of antagonist radiotracers to changes in 5-HT levels: serotonin would compete with a very small portion of the total binding pool of such tracers (225,275). This was also suggested by in vivo PET studies where agonists only show occupancies of 10-20% of the [^{18}F]antagonist-labelled sites (276). Numerous attempts with other 5-HT_{1A} radiotracers to demonstrate changes of binding induced by pretreatment or challenge with d-fenfluramine showed contrasted results. While pretreatment with d-fenfluramine at 10 mg/kg ip (274) and challenge studies with d-fenfluramine at 10 mg/kg iv in rats induced a significant decrease of [^{11}C]WAY100635 uptake in hippocampus (19), iv infusion of 5 mg/kg and 10 mg/kg of d-fenfluramine in conscious non-human primates did not induce significant changes in [^{18}F]MPPF binding (277). By contrast, [^{18F}]MPPF was sensitive to d-fenfluramine challenge in a dose dependent manner in

anesthetized rats (258). For [^{11}C]CUMI-101, a pre-injection with 2.5 mg/kg of d-fenfluramine and 2 to 4 mg/kg of citalopram iv in baboon was responsible for a binding decrease of 15 to 30 % across brain regions (130). In humans, one study showed no changes in binding potential of this radiotracer after infusion of 0.15 mg/kg of citalopram (132) whereas another study showed few increases of binding potential at post-synaptic areas after infusion of 10 mg of citalopram (133). No significant evidence of sensitivity to 5-HT release was shown for [^{18}F]FCWAY and [^{18}F]FPWAY (278).

III. Pretreatment study with d-fenfluramine

All these previous studies contrasted with our preliminary findings with the full agonist [^{18}F]F13640. Ex vivo autoradiography studies in rat brain revealed a 70% binding reduction following d-fenfluramine iv preinjections at doses of 0.5 mg/kg, 1 mg/kg and 5mg/kg injection in hippocampus, anterior cingulate cortex and dorsal raphe whereas only a tendency was observed for [^{18}F]MPPF at in the same conditions (261). These results suggested that [^{18}F]F13640 is very sensitive to changes in 5-HT levels, especially in view of the fact that the doses of d-fenfluramine needed for a significant effect were ten times lower than those used for [^{18}F]MPPF. For the present study, we therefore chose to use a dose of 1 mg/kg of d-fenfluramine, which is lower than the doses used in previous studies investigating the sensitivity of 5-HT_{1A} radiotracers but that were anticipated to be high enough to induce strong decreases of [^{18}F]F13640 binding. As expected, 1 mg/kg of d-fenfluramine administered in pretreatment or a challenge induce marked changes in [^{18}F]F13640 labeling kinetics (Figure 2 and 3). The pre-injection of d-fenfluramine induced a highly significant decrease of agonist radiotracer signal, and the blocking rate calculated in pre-injection was higher for hippocampus, anterior cingulate cortex and dorsal raphe in comparison with the previous ex vivo autoradiography study (58%, 60% and 55%, respectively) (261). The grey matter of the cerebellum was the most impacted region (90%) as it will be discussed later.

IV. Challenge study with d-fenfluramine

In this series of experiments, where d-fenfluramine was injected 30 minutes after the radiotracer, we did not observe pronounced effects as for the previous pretreatment studies. This was expected, given the slow dissociation rate of this radiotracer (198), due to its high affinity for 5-HT_{1A} receptors combined with the short PET acquisition time of 90 minutes. Another mechanism that could contribute to the differences in absolute occupancy values between pretreatment and challenge studies would be a massive internalization of receptors after pretreatment studies, leading to a low density of high affinity sites at the surface of neurons (279,280). However, this hypothesis seems

unlikely because time activity curves displayed a slope inflection 10 minutes after serotonin release induced by d-fenfluramine in almost all regions of interest except the centrum semiovale. Although occupancy by 5-HT was lower when d-fenfluramine was administered 30 min after ^{18}F-F13640, it was significantly different from control scans in all regions of interest, with values ranging from 10% in the thalamus to 31% in the grey matter of cerebellum. Accordingly, the voxel-based analysis detected significant decreases of [^{18}F]F13640 in many regions, including the dorsal raphe and in several serotonergic projection areas (precuneus, cingulate, parietal and occipital cortices, colliculi, and cerebellar cortex).

V. Changes of [^{18}F]F13640 binding in cerebellum

The results in the cerebellum can be puzzling considering the high uptake of [^{18}F]F13640 in the cortical parts and the highest amplitude of effects in pretreatment and challenge paradigm. These in vivo data are also in discordance with our in vitro autoradiography results in the same region, i.e., a low level of binding which is not affected by serotonin displacement and not influenced by addition of Gpp(NH)p in buffer. Classical 5-HT$_{1A}$ radiotracers also show low specific binding in the cerebellum (281,282). However, the present in vivo results must be compared with previous data revealing decreased [^{18}F]F13640 binding after pre-administration of a 5-HT$_{1A}$ antagonist or agonist, indicating the existence of 5-HT$_{1A}$ receptors in the cerebellum (261) . Furthermore, 5-HT release could occur in this region given that cat cerebellum contains projections of 5-HT neurons (232,233). In this regard, 5-HT iontophoresis in cerebellar grey matter in cat induces strong inhibitory effects on local neurons - these are mediated by 5-HT$_{1A}$ receptors, highlighting the functional importance of cerebellar 5-HT$_{1A}$ receptors in cerebellum of this species (230). An autoradiographic study using a radiolabelled SSRI, [^{3}H]paroxetine, also indicates that 5-HT transporter expression occurs in the cat cerebellum, both in the granular layer and the dentate nucleus (283). In this context of cerebellar heterogeneity of 5-HT$_{1A}$ receptor density, and strong effects of d-fenfluramine in the grey matter, we did not consider the cerebellar nuclei as a reference region. Instead, we identified a region in the anterior part of the white matter centrum semiovale that displayed consistently low signal in the three conditions and was less likely to be impacted by partial volume effects (Figure 4). This region was therefore used as reference, similarly to a previous study (42), for estimation of binding ratios and for the lp-ntPET modeling approach.

VI. Kinetic modelling of serotonin release

The kinetic modelling approach used in this study calculated that fenfluramine-induced serotonin release caused an increase of 110-130% of receptor occupancy by serotonin (Figure 6). We observed a delay of 45 min between d-fenfluramine administration and the maximal occupancy effect. Furthermore, we noticed that modelled slopes of serotonin release were relatively close in the four cats but with a significant variability). Finally, the kinetic modelling results suggest an apparent slow 5-HT release after d-fenfluramine injection, which is unexpected given its fast kinetics observed using microdialysis experiments. In fact, the slow washout of [^{18}F]F13640 seems to be responsible for this difference. Furthermore, results must be analyzed with caution because anesthesia is considered to change endogenous levels of 5-HT (284) and numerous studies on conscious animals reveals differences in 5-HT levels or radiotracer binding (225,258,284).

In the absence of microdialysis, the lp-ntPET model provides the first modeling of serotonin release induced by d-fenfluramine with a PET radiotracer of serotonin receptors. We proposed a lp-ntPET model which successfully discriminates control and challenge condition and confirms the hypothesis of a tracer displacement by a significant release of serotonin. The short acquisition time of 90 min appears as the major limitation of our study given the slow wash-out of the radiotracer (261). However, these results confirm that [^{18}F]F13640 binding is reversible, despite slow kinetics, by demonstrating its sensitivity to serotonin release. Further studies using [^{18}F]F13640 will need to be carried out using longer time scans to improve estimation of serotonin occupancy.

CONCLUSIONS

In conclusion, as compared with previous antagonist or partial agonist radiotracers, the present results demonstrate a high sensitivity of [^{18}F]F13640 to serotonin release induced by d-fenfluramine. Although we used a low dose of d-fenfluramine (1mg/kg), a significant displacement of [^{18}F]F13640 was observed for both pretreatment and challenge studies. These results support our initial hypothesis that an agonist PET tracer is better adapted to measure endogenous levels of serotonin than antagonist PET tracers. Indeed, while the agonist PET tracer, [^{18}F]F13640, binds only to G-protein-coupled 5-HT_{1A} receptors, in the same manner as the endogenous neurotransmitter, antagonists binds to both G-protein-coupled and uncoupled receptors. Consequently, antagonist PET tracers appear less effective to detect changes in serotonin levels, especially when G-protein-coupled receptors constitute only a small proportion of the total receptor population (281). Finally, the first kinetic modelling of serotonin release using [^{18}F]F13640 as radiotracer demonstrates the feasibility of

evaluating 5-HT release in displacement experiments. The slow kinetics of our radiotracer indicate the necessity to perform longer acquisition times (or delayed PET scans) to ensure a better understanding of displacement or pretreatment studies, but also enable to perform displacement experiments without using a bolus followed by constant infusion administration. Overall, these results support the use of [^{18}F]F13640 to investigate changes in serotonin levels in humans, particularly in the context of experimental paradigms involving physiological (sleep/wake states) or pathological (neuropsychiatric pathologies) fluctuations of extracellular serotonin.

FIGURES

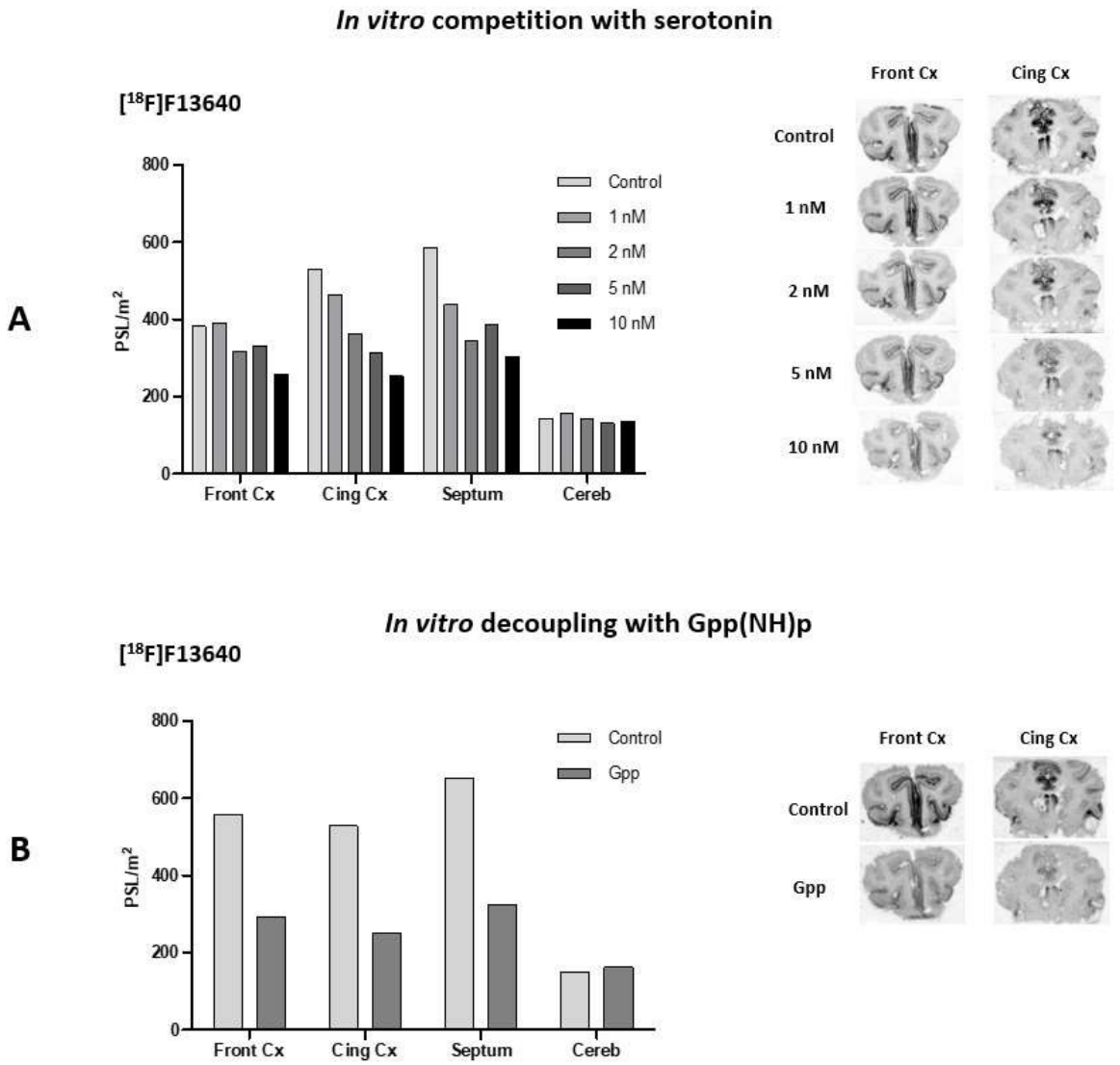


Figure 1. ***A***: *[18F]F13640 in vitro binding in cat brain with increasing concentrations of serotonin. (Front Cx = frontal cortex; Cing = cingulate cortex; Septum: lateral septum ; Cereb = cerebellum).* ***B***: *[18F]F13640 in vitro binding in cat brain with addition of 10* µM of Gpp(NH)p*. (Front Cx = frontal cortex; Cing Cx = cingulate cortex; Septum: lateral septum; Cereb = cerebellum).*

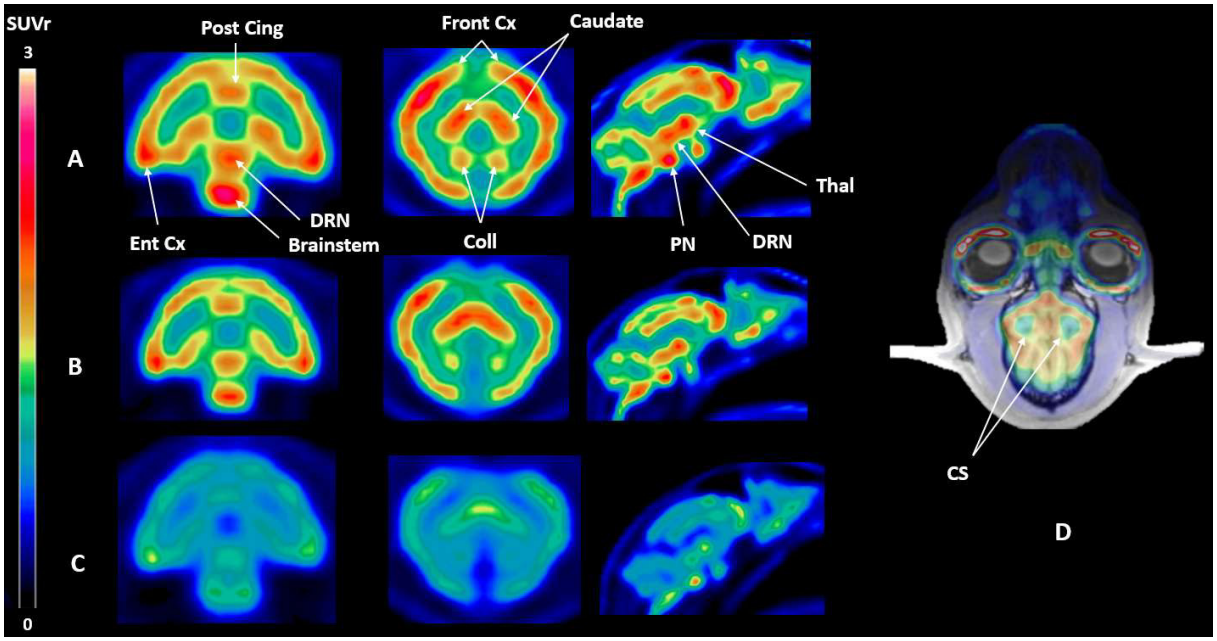


Figure 2. *SUVr PET images of [^{18}F]F13640 binding in the three experimental conditions, i.e.,* ***A****: control conditions,* ***B****: injection of d-fenfluramine 30 min after PET acquisition beginning;* ***C****: preinjection of d-fenfluramine 30 min before PET acquisition, using the centrum semiovale as a reference region (****D****). SUVr images are averaged from 32 to 90 min time of acquisition. (Post cing=posterior cingulate cortex; Front Cx=frontal cortex; Caudate=caudate putamen; Ent Cx= entorhinal cortex; DRN=dorsal raphe nucleus; PN=pontine nucleus; Thal: thalamus; Coll: colliculi; CS: centrum semiovale).*

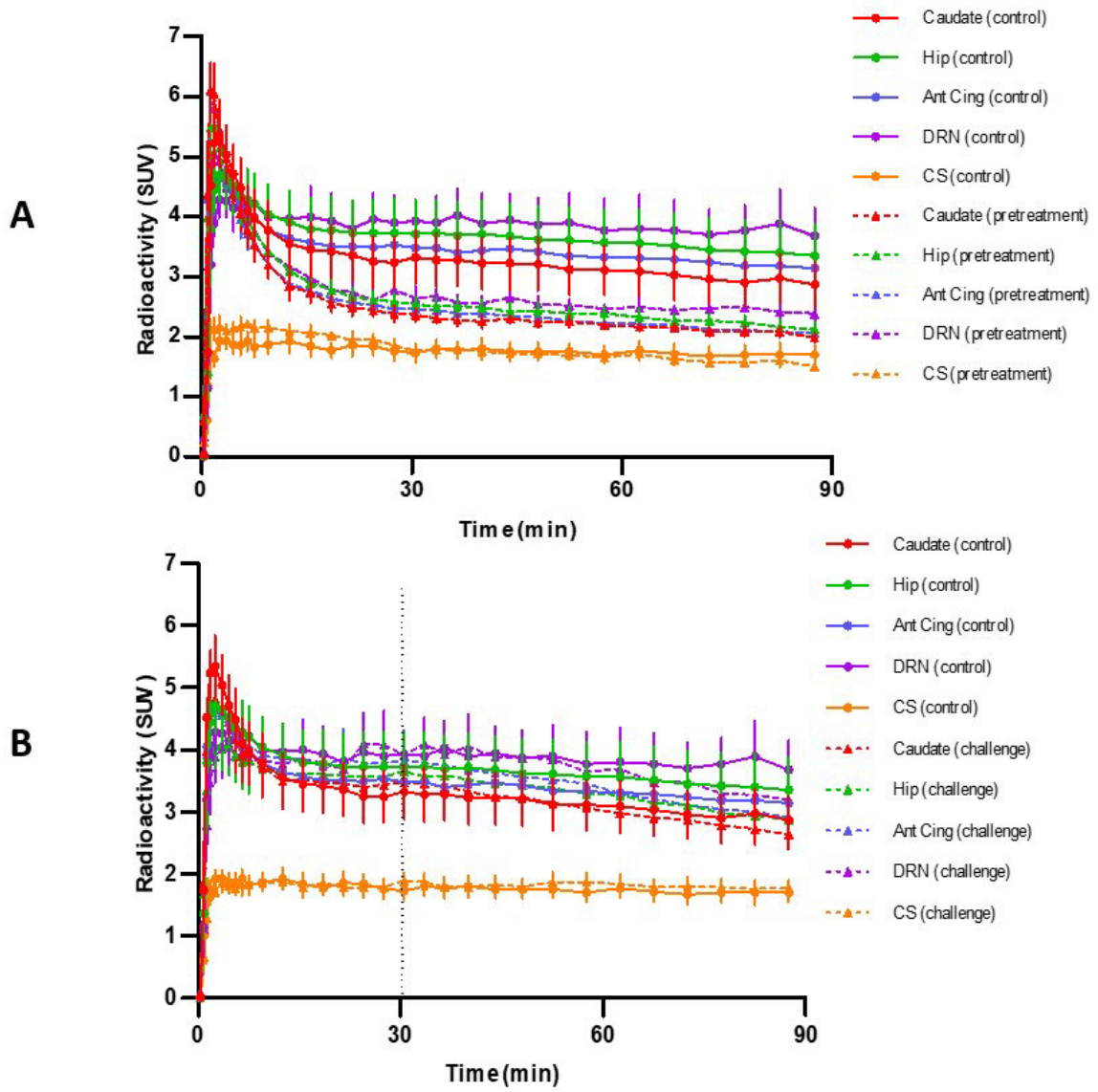


***Figure 3**. **A**: averaged time-activity curves of [^{18}F]F13640 +/- SEM (circles, control conditions; triangles, pretreatment study with a preinjection of 1 mg/kg of d-fenfluramine, 30 min before PET acquisition). **B** Averaged time-activity curves of [^{18}F]F13640 +/- SEM (circles, control conditions; triangles, challenge study with a postinjection of 1 mg/kg of d-fenfluramine, 30 min after beginning of PET acquisition). Caudate = caudate putamen; Hip = hippocampus; Cereb = cerebellum; Ant Cing = anterior cingulate cortex; DRN = dorsal raphe nucleus; CS = centrum semiovale.*

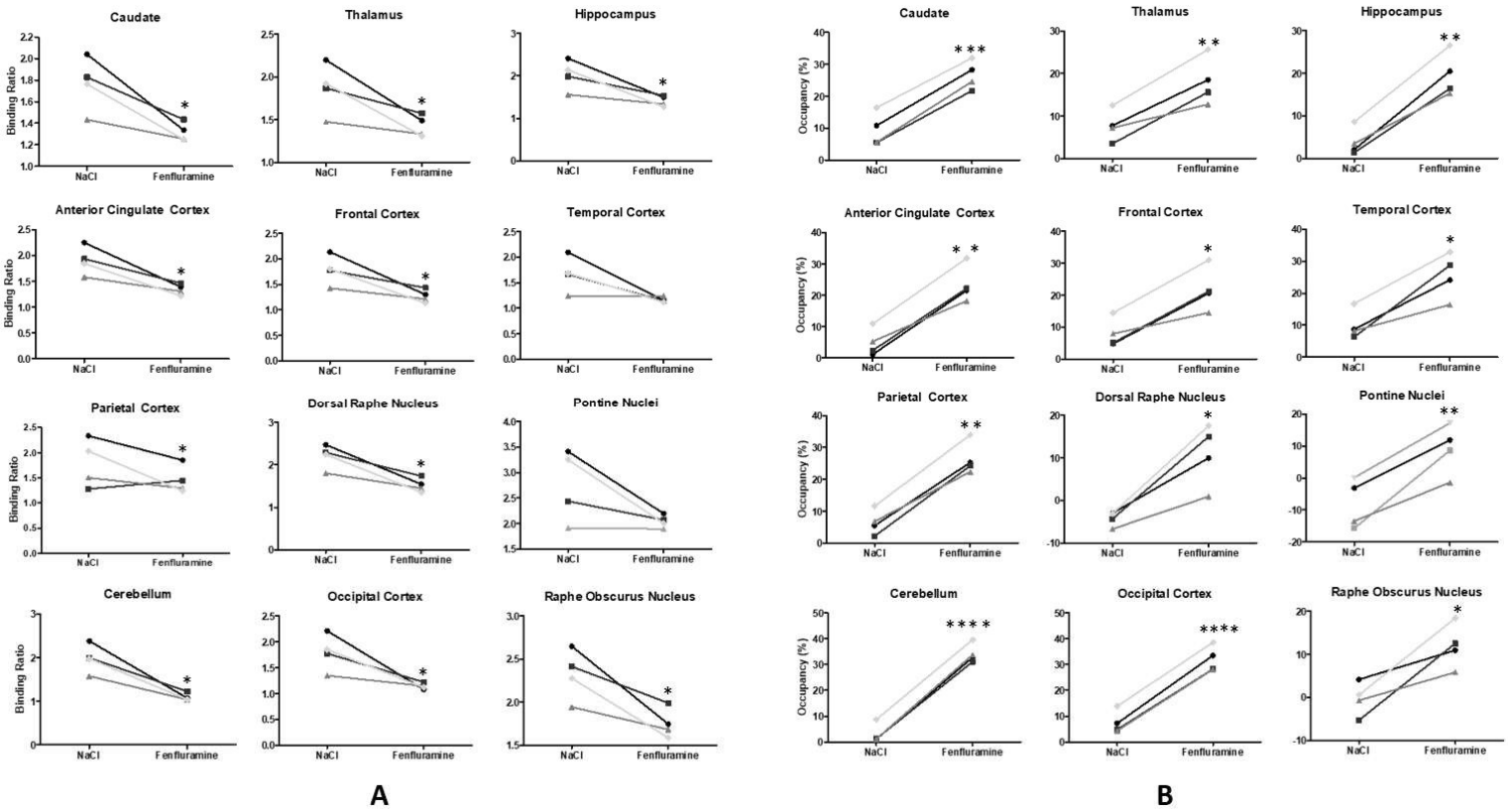


Figure 4. ***A****: averaged binding ratios of [^{18}F]F13640 calculated in control (NaCl) and pretreatment (d-fenfluramine) conditions in the four cats. (*p<0,05;**p<0,01;****p<0,0001).* ***B****: Occupancy (%) of serotonin calculated in control (NaCl) and challenge (d-fenfluramine) conditions in the four cats. (*p<0,05;**p<0,01;****p<0,0001). For values see table 1.*

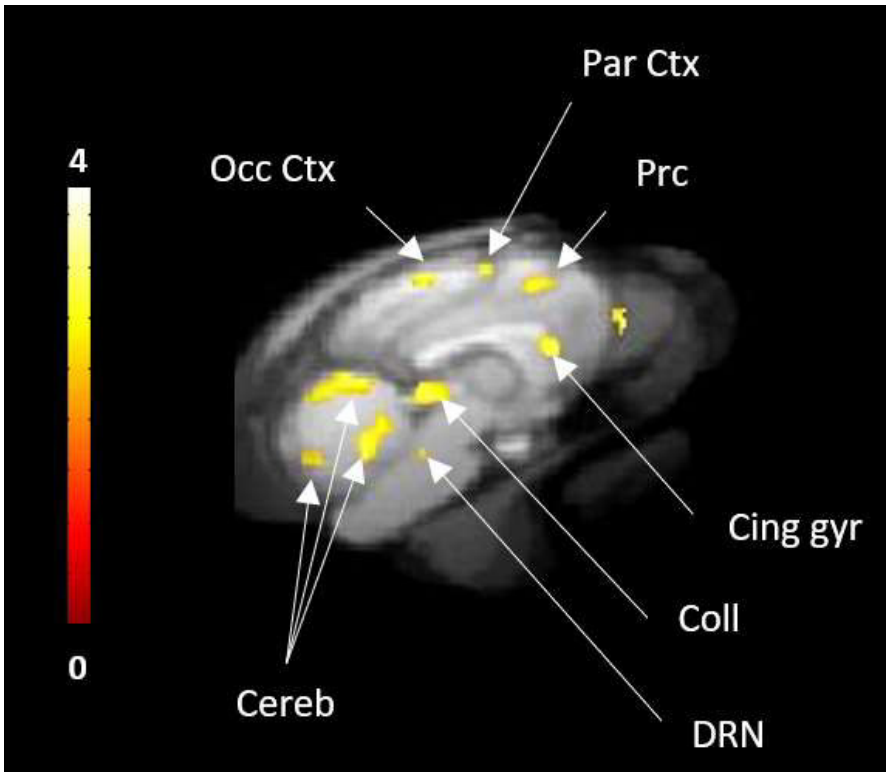


***Figure 5**. voxel-to-voxel analysis from 30 to 90 minutes PET acquisition, showing the significant decreases of [^{18}F]F13640 binding after d-fenfluramine challenge compared to control scans (p<0.01, non-corrected). Occ Ctx: Occipital Cortex; Par Ctx: Parietal Cortex; Cing gyr: Cingulate gyrus; Coll : Colliculi ; DRN : Dorsal raphe Nuclei; Cereb: Cerebellum; Prc: precuneus).*

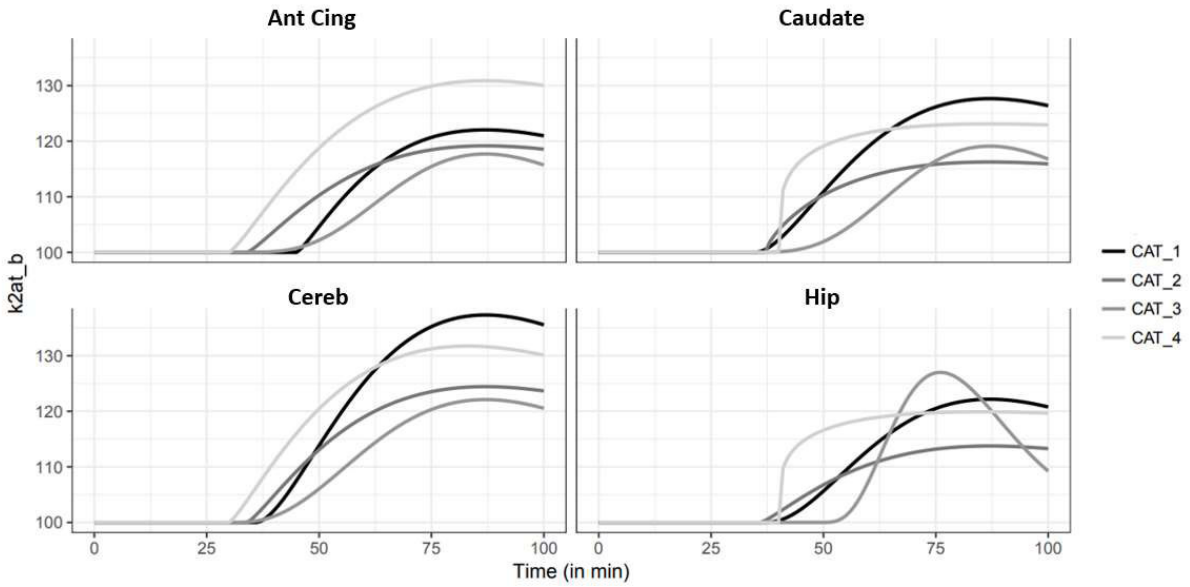


***Figure 6**: simulation of the kinetics of serotonin release illustrated by variation (%) of the efflux rate k2at_b of 4 regions of interest (Ant Cing=anterior cingulate cortex; Caudate= caudate putamen; Cereb= cerebellum; Hip= hippocampus).*

*

	Caudate	Thal	Hip	Cereb	Ant Cing	Front Cx	Temp Cx	Occ Cx
Pretreatment study on cats (n=4)								
Blocking rate (%+/-sd)	56+/-14	47+/-18	57+/-17	90+/-8,7	60+/-13	63+/-19	61+/-42	77+/-16
Challenge study on cats (n=4)								
Occupancy* (%+/-sd)	17+/-1,5	10+/-3,4	16+/-3,1	31+/-1,2	19+/-3,8	14+/-4,8	16+/-5,8	25+/-1,3
Occupancy lp-ntPET*(%+/-sd)	12+/-0.6	13+/-1.5	14+/-2,2	16+/-0,6	13+/-3,3	12+/-2,6	13+/-3,1	14+/-2,2

*Table 1: 5-HT_{1A} receptor occupancy rate calculated for pretreatment study, challenge study (standard analysis and lp-ntPET modelling). *Occupancy rate were adjusted on control condition for challenge study. (Caudate=caudate putamen; Thal=thalamus; Hip=hippocampus; Cereb=cerebellum; Ant Cing=anterior cingulate cortex; Front Cx: frontal cortex; Temp Cx: temporal cortex; Occ Cx: occipital cortex).*

CHAPITRE 7 : PREMIER PASSAGE A L'HOMME DU [^{18}F]F13640

I. Introduction

Le premier passage à l'homme du [^{18}F]F13640 était initialement l'objectif principal du travail de thèse. En effet, si l'on récapitule l'ensemble des études précliniques du radiotraceur nécessaires pour argumenter son passage à l'homme, on voit que tous les prérequis nécessaires sont réunis. On notera que le grand avantage de ce radiopharmaceutique-candidat est qu'il bénéficie d'un dossier complet et bien documenté concernant son équivalent froid, le F13640, qui a été mené comme médicament jusqu'en phase II. Cela a facilité la constitution du dossier d'essais cliniques. Cela n'a toutefois pas empêché de réaliser à nouveau une étude de toxicologie imposée par les autorités réglementaires. Hélas, la longueur des procédures administratives, l'essai clinique de phase 0 ou phase 1 précoce (NCT03347331 ; 2017-002722-21) du [^{18}F]F13640 n'a pu être mené de bout en bout pour assurer sa présentation complète lors de la soutenance de thèse. Aussi, nous nous proposons ici de présenter les résultats des 3 premiers sujets volontaires sains testés et les conclusions intermédiaires qui leur sont associées. Nous avons construit un protocole avec l'objectif de modéliser la pharmacocinétique du radiotraceur [^{18}F]F13640 et de calculer des potentiels de liaison. Il s'agit ici de faire la preuve de concept inédite que ce radiotraceur agoniste est le reflet des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels.

II. Matériel et méthodes

A. Sujets

Les sujets étaient des hommes volontaires sains d'âge compris entre 20 et 45 ans recrutés sur le site de l'hôpital Pierre Wertheimer et de l'université de Lyon via la diffusion d'annonces. Les trois premiers sujets recrutés ont été informés et ont signé un consentement avant leur participation à l'essai clinique, conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques. Parmi les critères d'exclusion, on retient l'existence de désordres psychiatriques ou neurologiques, l'existence dans les 3 derniers mois d'un traitement avec un effet connu sur le métabolisme de la sérotonine, l'existence d'une maladie infectieuse active, des contre-indications aux inhibiteurs de sérotonine (allongement du QT), contre-

indications à l'IRM, la prise de médicaments psychotropes dans le mois précédent l'inclusion, la prise d'antalgiques morphiniques dans les 3 jours précédents l'examen d'imagerie, la prise de cannabis dans la semaine ayant précédé l'examen et les volontaires ayant une pathologie médicale grave ou associée.

B. Radiosynthèse

Le précurseur chimique du [^{18}F]F13640 a été fourni par la société Neurolixis Inc (Dana Point, CA, USA & Castres, France). Il a été qualifié « Bonne Pratiques de Fabrication » (BPF) par la société ERAS Labo de Saint-Nazaire-les-Eymes après recristallisation et mise en forme aliquotée. Le précurseur (avec groupement nitré) du F13640 est marqué au fluor-18 en utilisant l'anion $^{18}F^-$ comme réactif de la substitution nucléophile (le groupement $–NO_2$ est « partant », remplacé par l'atome de ^{18}F). La préparation du [^{18}F]F13640 se réalise à l'aide d'un automate de synthèse Neptis (ORA, Belgique) selon une méthodologie classique de radiomarquage TEP utilisée pour de nombreux radiopharmaceutiques fluorés (à Lyon, le [^{18}F]MPPF, utilisé chez l'homme, est radiomarqué selon ce principe). Les fluorures produits par le cyclotron sont élués avec du Kryptofix dans un mélange acétonitrile/eau. Ils subissent ensuite un séchage azéotropique. Le précurseur du F13640 (c'est-à-dire la forme nitrée) est mis en solution dans 3 ml de DMSO puis est mis en contact avec les fluorures. La quantité de précurseur utilisée pour chaque lot est de 5 ± 0,1 mg. Ce radiomarquage se réalise à l'aide d'un kit stérile à usage unique, fournit par la société ABX et de même modèle que celui utilisé pour les synthèses radiopharmaceutiques du [^{18}]-FDG sur l'automate de synthèse GE TRACERlab (« Cassette for the GE TRACERlab Mx_{FDG} »). Une HPLC semi-préparative de purification est réalisée sur le produit obtenu. Lors de chaque synthèse, il y a production d'un lot unique (dans un volume de 1 ml avant dilution et mise en seringue) sous forme d'une unité destinée à un seul sujet. Le rendement de la réaction de marquage corrigé de la décroissance radioactive est de 6% (typiquement, l'activité d'entrée est de 45 GBq et l'activité EOS, en fin de synthèse, est de 2,6 GBq). Il est à noter que ce rendement, relativement faible, est habituel dans la production de radiopharmaceutiques TEP. A la fin de la synthèse, un lot de 1850 MBq est produit. Cette activité est contenue dans un flacon d'environ 1 ml d'éthanol.

C. Contrôle qualité

L'exigence des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et des Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) a nécessité la construction d'un cahier des charges bien précis définissant les contrôles qualités à la suite de sortie du [^{18}F]F13640. Les contrôles réalisés sur le produit fini sont résumés dans le tableau suivant.

Test	Méthode	Spécifications
Contrôles réalisés, avant administration, sur la préparation diluée au 10ème		
Apparence de la solution	Examen visuel	Limpide incolore
Examen visuel de l'intégrité du filtre	Examen visuel	Absence de traces de dégradation
Intégrité du filtre	Point bulle	> 50 psi
pH	Papier pH	Entre 4,5 et 7
Identification chimique	HPLC analytique C18 (barrette diode) avec détection radioactivité / UV	Conforme au spectre UV de référence
Pureté radiochimique	HPLC analytique C18 avec détection radioactivité/ UV	> 95%
	CCM (Recherche de fluorures monographie 01/2014 :1325)	Limites décrites dans la pharmacopée
Identification radiochimique	HPLC analytique C18 avec détection radioactivité / UV	Temps de rétention conforme au standard (à 10%)
Activité spécifique (EOS)	Mesure radioactivité du pic [^{18}F]F13640 en chambre d'ionisation	≥ 37 GBq/µmol
Teneur en F13640	HPLC analytique C18 avec détection radioactivité	< 10 µg dans la solution injectée
Impuretés (précurseur)	HPLC analytique C18 avec détection radioactivité	< 1 µg dans la solution injectée soit <10 %
Endotoxines	Appareil Endosafe®	<175UI/6mL
Kryptofix®	Spot test (Monographie 01/2014 :1325)	Limites décrites dans la pharmacopée
Contrôles réalisés, après administration, sur la préparation diluée au 10ème		
Solvants résiduels	Quantification des pics en CPG	MeOH<3000 ppm THF<720 ppm DMSO<5000 ppm
Stérilité	Ensemencement direct sur 3 milieux : aérobies, anaérobies, Sabouraud	Stérile
Identification radionucléidique	Spectrométrie et décroissance	511keV et demi-vie 110 min (à 10% près)
Dosage de l'éthanol	Quantification des pics en CPG	EtOH<250000 ppm

Tableau 7 : liste des contrôles réalisés sur le produit fini.

D. Prélèvements artériels

Un cathéter artériel au niveau de l'artère brachiale est posé avant chaque examen TEP. Il a pour objectif de réaliser une fonction d'entrée du [^{18}F]F13640. Autrement dit, l'objectif est de mesurer les concentrations de radiotraceur dans le sang et le plasma ainsi que les concentrations de métabolites de façon à obtenir la courbe plasmatique du [^{18}F]F13640. Cette courbe est assimilée à la quantité de radiotraceur qui entre dans le cerveau dans le modèle pharmacocinétique. Le schéma des prélèvements est récapitulé dans le tableau ci-dessous (Tableau 8). Il existe 3 modalités de comptage : comptage sanguin, plasmatique ou des fractions d'élution de métabolites. A chaque temps, selon les modalités de comptage, la quantité de sang prélevée est adaptée.

Temps après injection	n° tube	prélèvement (ml)	comptage	dosage des métabolites	Intervalle
00:00:00	1	1	sang	Ø	5s
00:00:05	2	1	sang	Ø	5s
00:00:10	3	1	sang	Ø	5s
00:00:15	4	2	sang + plasma	Ø	5s
00:00:20	5	1	sang	Ø	5s
00:00:25	6	1	sang	Ø	5s
00:00:30	7	1	sang	Ø	5s
00:00:35	8	1	sang	Ø	5s
00:00:40	9	1	sang	Ø	5s
00:00:45	10	1	sang	Ø	5s
00:00:50	11	1	sang	Ø	5s
00:00:55	12	1	sang	Ø	5s
00:01:00	13	2	sang + plasma	Ø	15s
00:01:15	14	1	sang	Ø	15s
00:01:30	15	1	sang	Ø	15s
00:01:45	16	1	sang	Ø	15s
00:02:00	17	2	sang + plasma	M2	30s
00:02:30	18	1	sang	Ø	30s
00:03:00	19	2	sang + plasma	Ø	2 min
00:05:00	20	2	sang + plasma	M5	5 min
00:10:00	21	2	sang + plasma	M10	10 min
00:20:00	22	2	sang + plasma	M20	10 min
00:30:00	23	2	sang + plasma	M30	10 min
00:40:00	24	2	sang + plasma	M40	10 min
01:00:00	25	2	sang + plasma	M60	10 min
01:15:00	26	2	sang + plasma	M75	10 min
01:30:00	27	2	sang + plasma	M90	

Tableau 8 : tableau récapitulant le schéma des prélèvements artériels.

A l'issue des prélèvements, chaque tube suit un protocole de comptage définit par le schéma suivant :

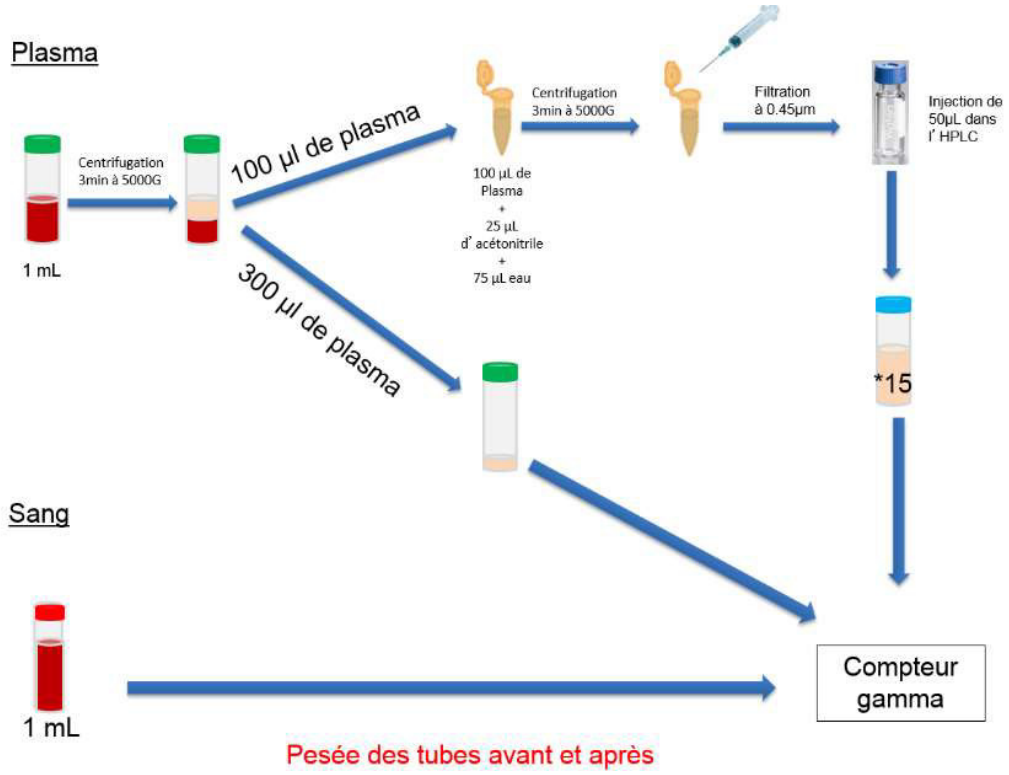


Figure 51 : schéma du traitement des tubes après prélèvement.

Pour les temps où un comptage de métabolite est requis, 15 fractions d'élutions d'une minute sont réalisées par HPLC (Colonne C-18 phase inversée C-18 (C18 Nucleodur 5 µm, 4.6×250 mm column; Elution par Eau/Acétonitrile/TFA 60%/40%/0.1%) à un débit de 0.9 ml min^{-1}. On notera qu'une pesée des tubes de sang total avant et après est réalisée pour calculer la concentration de radioactivité. Le compteur utilisé est l'automate Gamma Wizard 2480, Perkin Elmer. Pour chaque tube le temps de comptage choisi est de 1 minute.

E. Examens d'imagerie

1. IRM

Pour permettre des corrélations anatomo-fonctionnelles, un examen IRM 3D-T1 est réalisé. L'acquisition IRM consiste en une séquence 3D anatomique T1 sur le scanner IRM du CERMEP. Le volume anatomique qui couvre l'ensemble du cerveau comprend 176 coupes avec des voxels cubiques de 1 mm^3 et 256x256 voxels dans chaque coupe transverse. La séquence réalisée est une acquisition T1 3D selon le protocole ADNI (285). Les coupes sont réalisées selon trois plans orthogonaux (sagittal, axial, coronal) en fonction d'un plan axial de référence orienté selon le plan bi-commissural de Talairach, passant par le centre des deux commissures blanches antérieure et postérieure, correspondant au système référentiel universel. La durée totale de l'examen sera de 30 minutes.

2. TEP-CT

L'acquisition TEP de chaque volontaire sain est effectuée après la réalisation de l'IRM et dure 90 minutes. Le tomographe utilisé est la caméra TEP/CT Siemens Biograph mCT installée au CERMEP, qui permet l'acquisition simultanée de 109 coupes jointives de 2,027 mm d'épaisseur, avec une résolution spatiale de 4,4 mm au centre du champ de vue. Les coefficients d'atténuation des tissus crâniens sont obtenus par une acquisition au scanner X intégré à la caméra. Cet examen à basse dosimétrie dure 1 minute avant l'acquisition TEP. La dose injectée correspond à une dose de charge de 150 MBq pour tous les individus à laquelle sera ajoutée une dose pondérale de 1MBq/Kg. Ainsi, pour un individu de 50 Kg (poids minimum). La dose injectée est de 200 MBq +/-10%, soient 5.4 mCi. Pour un individu de 90 Kg (poids maximum) la dose injectée est de 240 MBq +/-10%, soient 6.5 mCi. En sachant que l'activité spécifique obtenue sera au mieux de 1.5 Ci/µmol, les quantités pondérales injectées varieront donc sur l'intervalle [1.4 - 1.7] µg (c'est-à-dire à microdose, bien en dessous de quantités à effet pharmacologique). L'injection est faite en en bolus (30 secondes environ), suivi d'une rinçure par du sérum physiologique. Les 3 premiers volontaires suivent, après l'acquisition TEP de 90 min, un balayage corps entier (jusqu'au pelvis). La durée du balayage est de 10 min. Ce balayage corps entier permet d'obtenir un premier aperçu de la biodistribution du radiotraceur et de des métabolites dans l'organisme.

F. Traitement des données

Pour chaque individu, une image TEP dynamique est reconstruite selon une série de 28 séquences (12*10s;6*20s;6*60s et 16*300s). Les images TEP sont reconstruites en 3 dimensions en suivant la reconstruction OP-OSEM. Elles sont prétraitées en utilisant l'outil MINC (Mc Connell Brain Imaging Centre, Montréal) et modélisée avec les programmes du centre TEP de Turku sur le logiciel SPM®. Pour chaque sujet, l'atlas Hammers est appliqué sur l'image TEP (286). La radioactivité de chaque région est extraite en kBq/mL. Les premiers essais de modélisation sur le logiciel pmod® sont effectuées sur 25 régions jugées pertinentes pour l'analyse des récepteurs 5-HT_{1A}. On élimine aussi les régions trop petites susceptibles de bruiter l'analyse. Les régions choisies sont les suivantes : hippocampe droit et gauche, amygdales droit et gauches, Gyrus temporal inférieur et médian droit et gauche, Cervelet Droit et Gauche, Insula Droit et gauche, partie latérale du lobe occipital droit et gauche, partie antérieure du gyrus cingulaire droite et gauche, gyrus frontal médian droit et gauche, gyrus frontal supérieur droit et gauche, noyau caudé droit et gauche, putamen droit et gauche, thalamus droit et gauche et corps calleux. Par ailleurs, nous définissons la région substance blanche comme la somme de la radioactivité de la substance blanche présente dans chaque région cérébrale. Enfin pour les noyaux gris centraux, nous définissons le contour des régions en assemblant substance grise et substance blanche pour obtenir une région de taille suffisante pour limiter le bruit. Pour les autres régions seules la matière grise est prise en compte.

III. Résultats

A. Biodistribution

Les images TEP présentées ci-dessous sont produites en fin d'acquisition entre t_{90min} et t_{110min}. Elles indiquent une fixation osseuse liée aux fluorures et une forte fixation dans le foie. On retrouve ce tropisme hépatique avec le [^{11}C]CUMI101 après 90 minutes d'acquisition (287). Les causes de cette fixation relèvent de la physiologie du métabolisme à savoir un passage du radiotraceur dans les compartiments fortement perfusés en début d'acquisition et une concentration dans les compartiments d'élimination (foie, vessie) après 90 minutes. On note une fixation dans l'intestin grêle que l'on attribue à la présence de récepteurs 5-HT_{1A} exerçant un rôle dans la régulation de la motilité intestinale (288,289). Enfin on remarque une fixation au niveau des glandes salivaires, des ganglions axillaires et des glandes séminales. Cette première approche de biodistribution appelle une étude ultérieure de dosimétrie pour quantifier la dose efficace reçue.

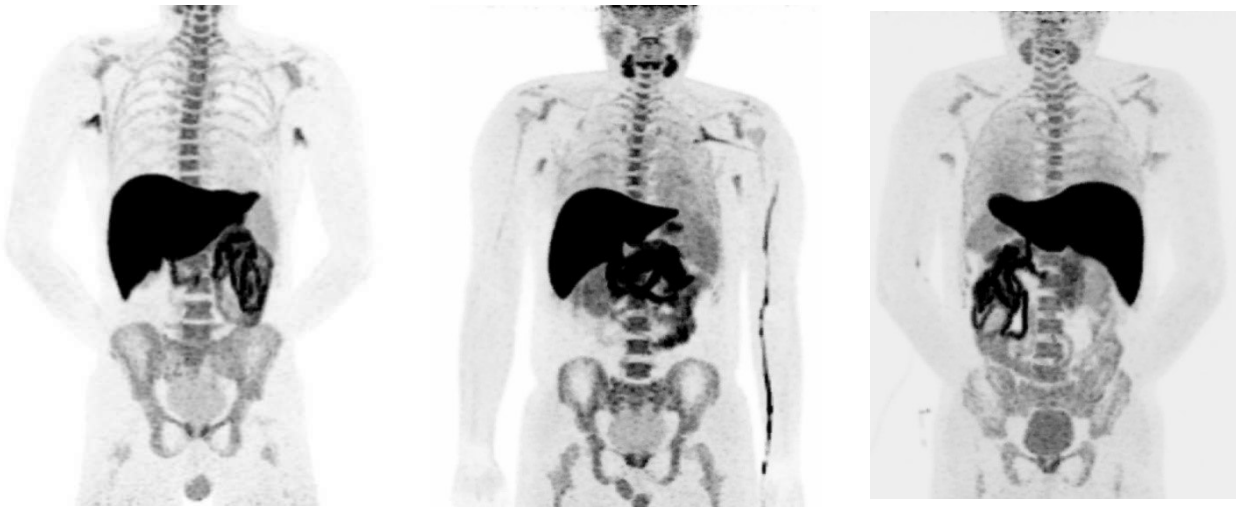


Figure 52 : vue antérieure TEP corps entier du [^{18}F]F13640 des 3 sujets réalisée.

B. Images TEP et courbes temps-activité

L'analyse des images TEP retrouve une liaison très corticale et ubiquitaire du radiotraceur comme pour les espèces étudiées dans les chapitres précédents. On retient une fixation dans le cortex préfrontal, les noyaux du raphé, le cortex du cervelet, le thalamus, l'hippocampe et le cortex cingulaire.

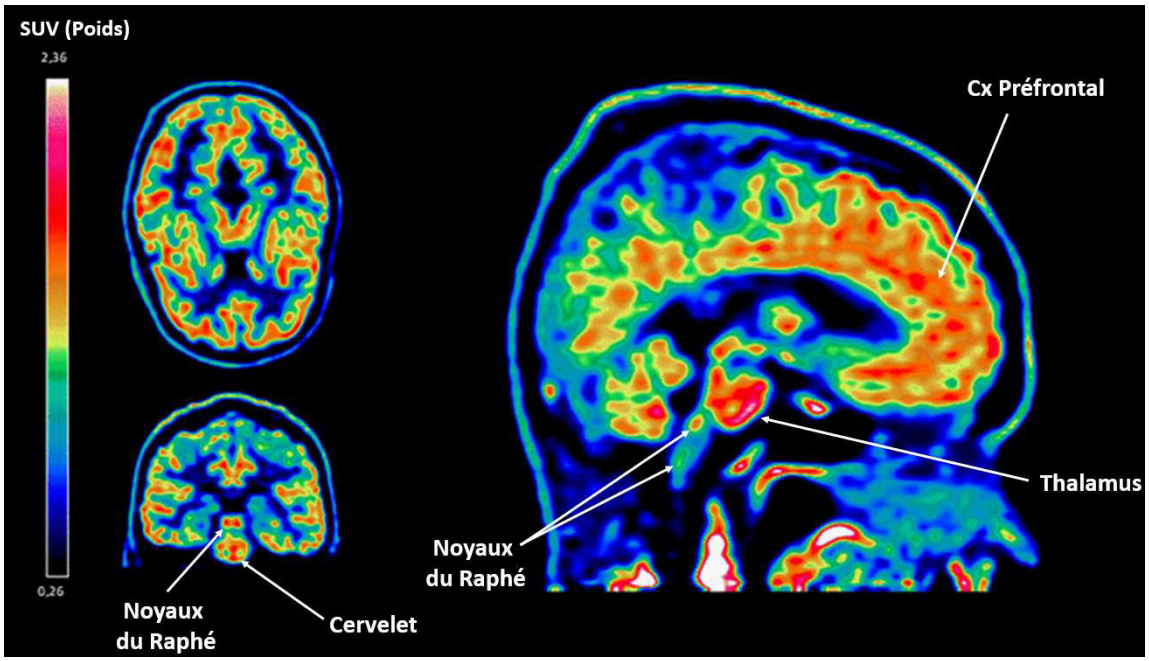


Figure 53 : image TEP statique [0-90]min d'un sujet.

On identifie un signal faible dans le corps calleux région proche de la région de référence que nous avions utilisé chez le chat (*Centrum Semiovale*). Enfin, on remarque une accumulation du radiotraceur avec une augmentation de la liaison au cours du temps.

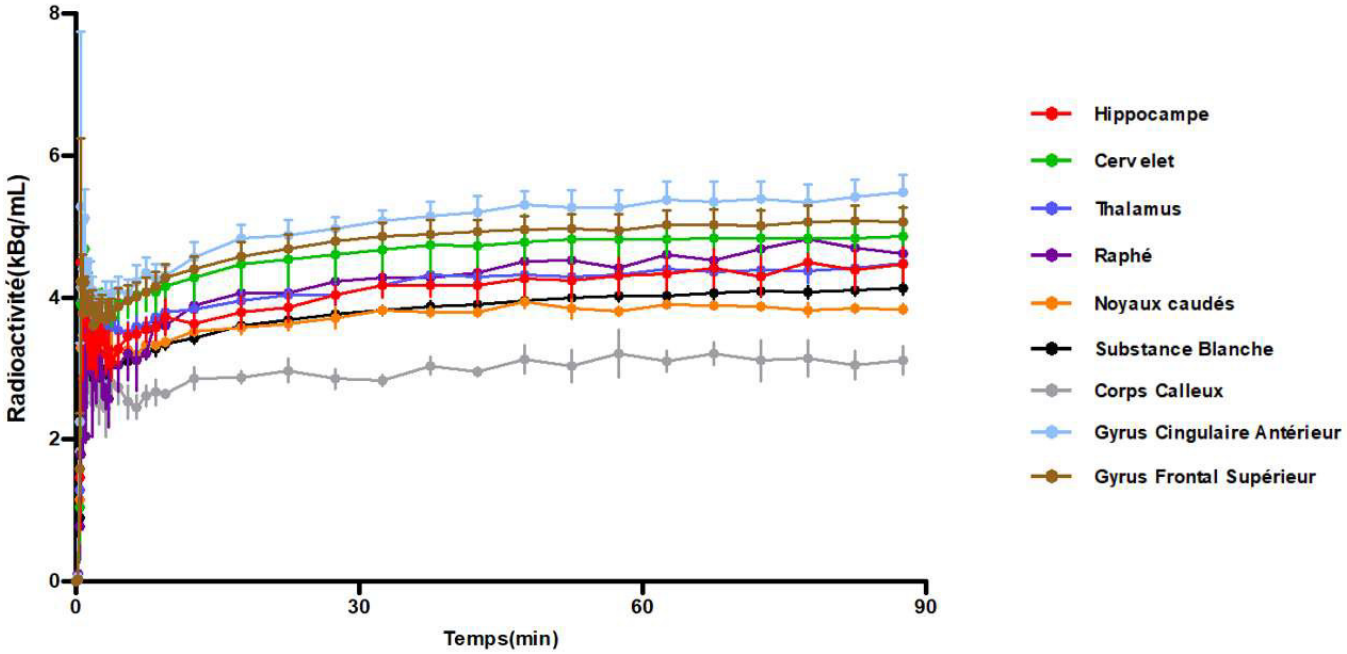


Figure 54 : courbes temps-activité des 3 sujets (Moyenne+/-SEM).

C. Métabolites

La détection des métabolites par HPLC a montré quelques limites. En effet, les conditions de formulation de l'échantillon ont été modifiées au cours des différents examens : patient 1, 75 µL plasma + 125 µL acétonitrile, non filtré; patient 2 : 100 µL plasma + 25 µL acétonitrile + 75 µL eau, non filtré ; patient 3 : 100 µL plasma + 75 µL acétonitrile, filtré. Le changement de ces conditions a été imposé par la qualité du comptage des fractions d'élution au compteur et la qualité de l'élution sur l'HPLC. Le nombre de coups enregistrés par le compteur était dans une gamme trop faible, proche des limites de sensibilité du compteur, lors des premières manipulations. Les échantillons ont donc été plus concentrés en radioactivité dans les examens suivants. Ensuite, on constate au cours des temps d'élution une augmentation croissante du bruit de fond. Ceci est compatible avec un relargage progressif de radioactivité par saturation de la colonne. On identifie bien le pic de [^{18}F]F13640 entre 5 et 7 minutes. Les autres pics observés sont considérés comme des facteurs confondants liés aux limites des conditions expérimentales.

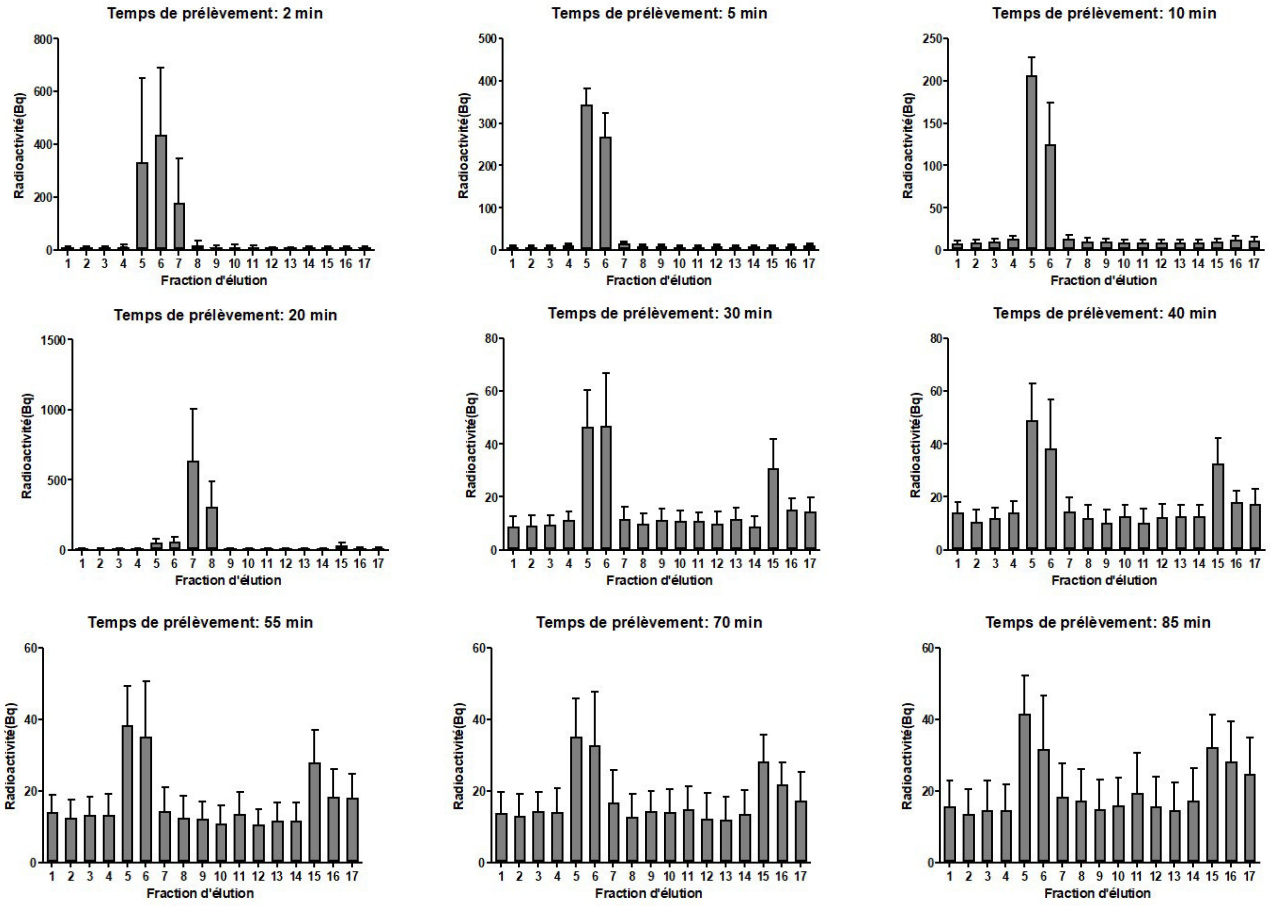


Figure 55 : moyenne de radioactivité +/- SEM des fractions d'élutions des échantillons plasmatiques au cours de l'acquisition. On notera 15 fractions d'élutions pour le patient 1 et 17 pour les 2 autres.

D. Fonction d'entrée

Au vu des limites imposées par la quantification des métabolites, du stade préliminaire de l'analyse, il a été choisi de montrer les fonctions d'entrée plasmatiques non corrigées des métabolites et ce d'autant plus que les études TEP précédentes n'ont montré que très peu de métabolites chez le rat (211). On note un ratio plasma sur sang de 1,7 pour le patient 1 et de 1,8 pour les 2 autres.

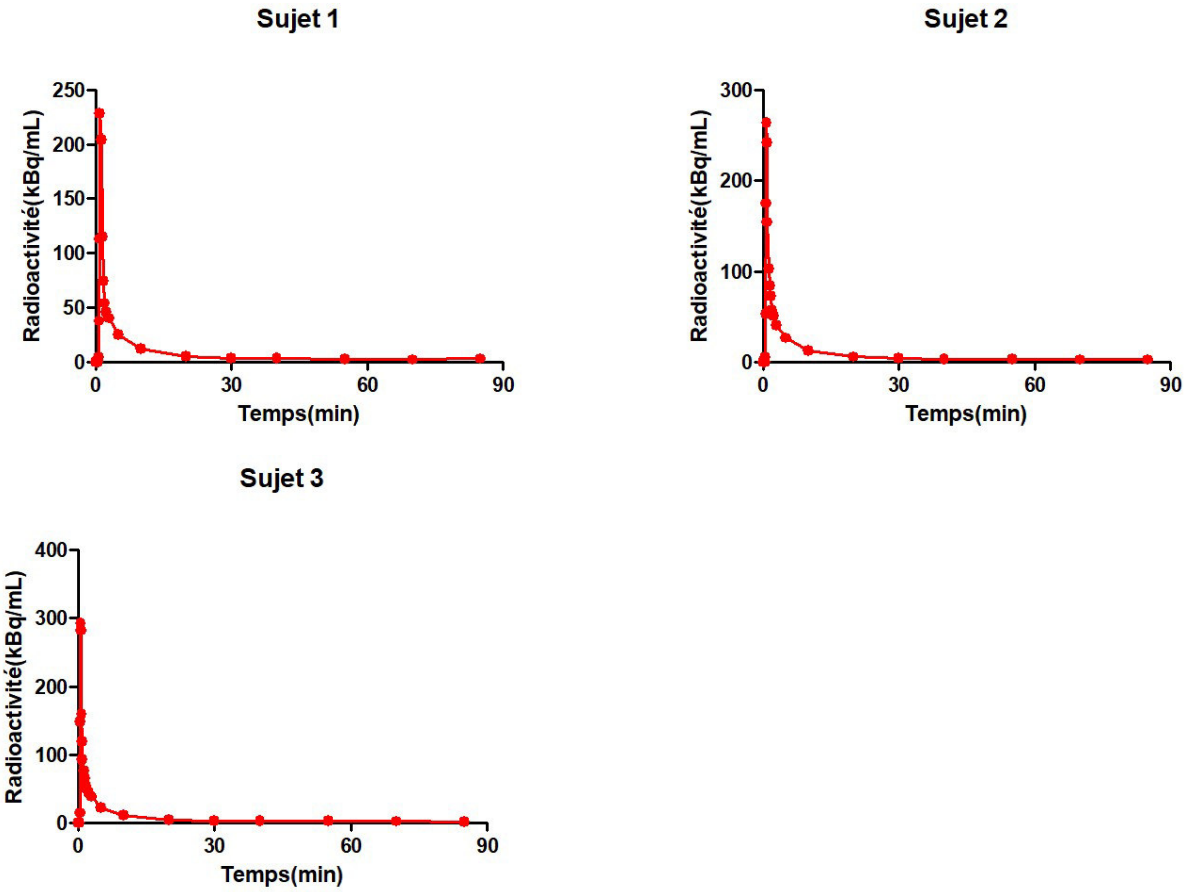


Figure 56 : fonction d'entrée plasmatique des 3 sujets.

E. Modélisation

Nous proposons ici les résultats de 3 modèles avec fonction d'entrée : modèle à 1 compartiment (1TC), modèle à 2 compartiments (2TC) et modèle Logan réalisés sur le logiciel pmod®

	Modélisation 1TC								
	Sujet 1			Sujet 2			Sujet 3		
	K1	Vt	AIC	K1	Vt	AIC	K1	Vt	AIC
L1	0,0077	2,6	139	0,010	1,5	159	0,012	1,7	99
L2	0,0076	2,6	160	0,010	1,4	155	0,012	1,6	112
L3	0,0077	3,7	136	0,010	1,7	146	0,011	2,0	101
L4	0,0073	8,4	151	0,010	1,8	143	0,011	2,1	118
L13	0,0094	2,3	133	0,012	1,6	133	0,013	1,5	102
L14	0,0097	2,0	127	0,011	1,8	131	0,013	1,6	90
L17	0,0100	1,4	108	0,012	1,2	134	0,015	1,9	81
L18	0,0101	1,5	109	0,012	1,2	138	0,014	1,8	76
L20	0,0091	2,6	143	0,011	1,8	137	0,013	1,7	99
L21	0,0095	2,3	128	0,012	1,7	138	0,013	1,8	96
L22	0,0095	1,8	123	0,013	1,2	148	0,014	1,3	84
L23	0,0096	1,6	115	0,012	1,3	135	0,015	1,2	109
L24	0,0106	1,9	127	0,013	1,7	151	0,014	2,1	97
L25	0,0108	2,1	126	0,013	1,7	156	0,015	1,7	85
L28	0,0108	2,0	119	0,013	1,4	141	0,014	1,8	86
L29	0,0105	2,1	120	0,013	1,4	138	0,014	1,8	86
L62	0,0093	1,7	124	0,012	1,3	144	0,014	1,5	76
L63	0,0094	1,6	122	0,012	1,3	144	0,014	1,6	83
L34	0,0077	1,9	144	0,010	1,1	129	0,010	1,3	122
L35	0,0082	1,5	135	0,010	1,0	141	0,011	1,2	99
L38	0,0094	2,0	129	0,012	1,2	129	0,013	1,3	104
L39	0,0100	1,6	125	0,013	1,2	139	0,013	1,4	97
L40	0,0090	1,7	121	0,011	1,3	144	0,013	1,5	93
L41	0,0088	2,0	124	0,010	1,3	146	0,012	1,3	101
L44	0,0064	1,0	158	0,006	13,1	170	0,008	0,9	116

Tableau 9: indices mesurés par le modèle 1TC.

	Modélisation Logan								
	Sujet 1			Sujet 2			Sujet 3		
	t*	VT	AIC	t*	VT	AIC	t*	VT	AIC
L1	65	0,75	66	60	1,76	69	60	1,85	69
L2	65	0,85	64	55	1,34	82	50	1,46	91
L3	60	1,04	71	45	2,31	103	35	2,39	121
L4	60	1,02	74	70	0,62	59	70	0,67	59
L13	45	1,66	98	30	1,63	106	30	1,68	107
L14	20	1,58	126	30	1,74	111	20	1,76	127
L17	20	1,47	121	25	2,09	115	20	2,14	118
L18	25	1,51	108	25	2,06	109	20	2,12	117
L20	25	1,68	133	55	2,61	72	30	1,95	127
L21	45	1,96	95	40	2,06	106	40	2,09	105
L22	20	1,53	127	20	1,61	133	20	1,70	124
L23	25	1,52	113	25	1,66	124	25	1,72	122
L24	30	1,68	132	30	2,57	130	25	2,56	137
L25	20	1,77	141	20	2,01	143	20	2,11	143
L28	20	1,76	123	25	2,01	110	20	2,06	112
L29	20	1,73	126	25	2,01	111	25	2,08	110
L62	20	1,48	125	30	1,85	109	20	1,85	125
L63	30	1,50	116	25	1,85	120	25	1,92	114
L34	55	1,04	82	50	1,22	87	50	1,27	86
L35	55	1,11	80	45	1,11	101	25	1,27	143
L38	35	1,72	118	25	1,62	137	20	1,67	145
L39	20	1,57	142	30	1,55	121	30	1,60	120
L40	60	1,08	72	25	1,70	135	25	1,76	136
L41	30	1,76	132	35	1,52	119	30	1,58	127
L44	55	0,79	80	50	0,88	91	40	0,94	109

Tableau 10: indices mesurés par le modèle Logan.

	Modélisation 2TC																				
	Sujet 1							Sujet 2							Sujet 3						
	K1	k4	k3/k4	K1/k2	Vs	Vt	AIC	K1	k4	k3/k4	K1/k2	Vs	Vt	AIC	K1	k4	k3/k4	K1/k2	Vs	Vt	AIC
L1	0,0077	0,74	0,00	2,68	0,000	2,68	144	0,01	0,01	7,08	0,32	2,29	2,62	163	0,01	0,01	11	0,22	2,50	2,72	100
L2	0,0076	2,96	0,02	2,54	0,049	2,59	165	0,01	0,01	15	0,12	1,83	1,96	159	0,02	0,01	22	0,10	2,19	2,29	113
L3	0,0074	7,31	0,00	10,34	0,004	10,34	141	0,01	0,02	17	0,12	1,95	2,07	150	0,01	0,00	2,37E+85	1,17	2,78E+85	2,78E+85	105
L4	0,0073	7,36	0,04	10,20	0,361	10,56	155	0,01	0,02	6	0,35	1,95	2,30	148	0,01	0,00	1,40E+97	1,07	1,50E+97	1,50E+97	122
L13	0,0093	0,82	0,01	2,25	0,028	2,28	138	0,01	0,02	7	0,27	1,99	2,26	137	0,01	0,03	2	0,63	1,18	1,81	106
L14	0,0098	1,15	0,04	1,92	0,075	2,00	132	0,01	0,02	6	0,34	2,06	2,40	135	0,01	0,02	2	0,75	1,36	2,11	94
L17	0,0102	0,00	4,09	1,13	4,631	5,76	112	0,02	0,01	14	0,13	1,71	1,83	136	0,02	0,02	6	0,36	2,04	2,40	83
L18	0,0101	0,57	0,05	1,40	0,072	1,48	114	0,02	0,01	16	0,11	1,77	1,88	139	0,02	0,02	6	0,35	2,05	2,40	77
L20	0,0091	5,34	0,00	2,51	0,000	2,51	148	0,01	0,01	11	0,22	2,44	2,66	141	0,01	0,02	6	0,33	1,91	2,24	102
L21	0,0095	0,65	0,01	2,27	0,018	2,29	133	0,01	0,02	11	0,19	2,21	2,40	142	0,01	0,02	8	0,27	2,20	2,47	99
L22	0,0095	2,99	0,06	1,67	0,100	1,77	128	0,02	0,01	21	0,09	1,86	1,95	148	0,02	0,01	21	0,09	1,77	1,85	65
L23	0,0096	0,59	0,02	1,59	0,039	1,63	120	0,02	0,01	14	0,13	1,78	1,91	137	0,03	0,01	29	0,06	1,75	1,81	80
L24	0,0106	0,62	0,00	1,95	0,000	1,95	132	0,02	0,01	24	0,10	2,49	2,59	154	0,01	0,00	5	1,02	5,16	6,18	101
L25	0,0108	0,65	0,00	2,02	0,004	2,03	130	0,02	0,01	32	0,08	2,65	2,74	158	0,02	0,01	18	0,12	2,24	2,37	81
L28	0,0109	0,65	0,00	2,03	0,003	2,03	124	0,02	0,02	13	0,14	1,85	2,00	144	0,02	0,02	4	0,45	1,91	2,35	89
L29	0,0105	5,37	0,00	2,11	0,000	2,11	125	0,02	0,02	9	0,20	1,77	1,98	141	0,02	0,02	6	0,33	2,02	2,35	87
L62	0,0093	0,93	0,05	1,65	0,078	1,73	129	0,02	0,01	14	0,14	1,86	1,99	146	0,02	0,02	10	0,19	1,91	2,10	72
L63	0,0094	0,87	0,00	1,61	0,000	1,61	127	0,02	0,01	16	0,11	1,75	1,86	147	0,02	0,02	9	0,21	1,97	2,18	81
L34	0,0101	0,57	0,05	1,40	0,072	1,48	161	0,01	0,01	9	0,15	1,44	1,60	132	0,01	0,04	2	0,60	0,91	1,51	127
L35	0,0082	0,75	0,00	1,52	0,000	1,52	140	0,01	0,02	5	0,23	1,06	1,29	145	0,01	0,02	11	0,13	1,45	1,58	100
L38	0,0094	0,28	0,00	1,97	0,000	1,97	134	0,02	0,01	11	0,15	1,72	1,87	129	0,02	0,01	6	0,31	1,80	2,12	105
L39	0,0100	2,62	0,03	1,60	0,048	1,65	130	0,02	0,01	19	0,09	1,73	1,82	139	0,02	0,02	9	0,20	1,75	1,95	96
L40	0,0090	0,65	0,00	1,70	0,005	1,70	126	0,01	0,01	9	0,20	1,76	1,96	148	0,01	0,02	8	0,22	1,84	2,06	94
L41	0,0088	0,26	0,00	2,01	0,005	2,01	129	0,01	0,02	11	0,16	1,72	1,88	150	0,01	0,02	6	0,26	1,69	1,95	102
L44	0,0064	0,80	0,00	1,04	0,000	1,04	162	0,01	0,23	2	4,77	10,45	15,22	175	0,01	0,01	1	0,61	0,79	1,39	120

Tableau 11 : indices mesurés avec le modèle 2TC.

L1 L2 Hippocampe D et G, **L3 L4** Amygdale D et G, **L13 L14** Gyrus Temporal Médian et Inférieur D et G, **L17 L18** Cervelet D et G, **L20 L21** Insula D et G, **L22 et L23** Partie latérale du Lobe olfactif D et G, **L24 L25** Gyrus Cingulaire antérieur supérieur D et G, **L28 L29** Gyrus Médian du Lobe Frontal D et G, **L62 L63** Gyrus Supérieur du Lobe Pariétal D et G, **L34 L35** Noyaux Caudés, **L38 L39** Putamen D et G, **L40 41** Thalamus D et G ; **L44** Corps calleux

IV. Discussion

Les données préliminaires du premier passage chez l'homme du [^{18}F]F13640 obtenue chez 3 sujets montrent une répartition ubiquitaire du radiotraceur dans le cerveau. Cela indique donc l'existence d'une réserve de récepteurs fonctionnels dans de nombreuses structures cérébrales. Ces observations sont à mettre au regard des images du [^{18}F]MPPF chez l'homme qui montrent une fixation très faible dans le cervelet (231). Ainsi, et si l'on exclut une cible non-5-HT^{1A}, non identifiée à ce stade, ces observations indiqueraient que le cervelet contient une faible proportion de récepteurs couplés.

Les cinétiques du [^{18}F]F13640 sont très lentes comme les modèles précliniques. Toutefois, elles semblent montrer une accumulation au cours du temps. L'analyse préliminaire des fractions d'élution ne retient pas de métabolites comme dans les données précliniques, on rejette donc l'hypothèse de l'entrée cérébrale de métabolites. Les données de la modélisation montrent plutôt une constante de dissociation k_4 faible qui pourrait expliquer cette accumulation du radiotraceur. En effet, en phase aigüe d'injection, il pourrait y avoir un déséquilibre entre les entrées cérébrales massives de radiotraceur modélisées par les courbes plasmatiques (Figure 56) et la sortie très lente du radiotraceur caractérisée par un k_4 faible (Tableau 11).

Dans ce contexte, on peut penser que la fenêtre [0-90] minutes n'est pas suffisante pour atteindre l'équilibre du radiotraceur. Cela pourrait expliquer les données de modélisations incohérentes que l'on observe. En effet, les données du modèle 2TC montrent des valeurs très faibles de volume de distribution dans le compartiment spécifique (Vs) et des valeurs importantes de volume de distribution dans le compartiment non spécifique (Vt-Vs).

Autrement dit, les régions riches en récepteurs 5-HT$_{1A}$ contiennent une grande quantité de radiotraceur non lié aux récepteurs. Le signal serait donc non spécifique. Etant donné la liaison spécifique du radiotraceur observée dans les modèles précliniques, on suppose que la fenêtre d'acquisition est bien trop courte pour exprimer son entrée et sa sortie cérébrale. La fidélité des estimations des macroparamètres et des microparamètres du modèle s'évaluant dans des conditions expérimentales prenant en compte l'ensemble de la cinétique du radiotraceur, on comprend bien que les données acquises sur 90 minutes sont tout à fait insuffisantes.

V. Conclusion

Devant cette modélisation non satisfaisante, un amendement a été proposé au protocole initial. Ce dernier prévoit notamment d'allonger la période d'acquisition du traceur. La liaison ubiquitaire ne facilitant pas la recherche d'une région de référence, le protocole prévoit comme alternative une méthode simplifiée d'estimation d'un volume de distribution caractérisé comme le ratio du signal du radiotraceur à l'équilibre sur la radioactivité du plasma artériel prélevé à l'équilibre. Etant donné le caractère invasif de la ponction artérielle, il est prévu de vérifier que le sang veineux estime correctement le sang artériel. Le cas échéant un simple prélèvement artériel sera jugé comme suffisant. Cet amendement s'appuie sur la méthode qui a été appliquée à un radiotraceur cannabinoïde CB_1 ayant une cinétique très lente, le [^{18}F]MK-9470 (290). Enfin, si les données de biodistribution n'indiquent pas de suraccumulation de traceur dans un organe, il convient de programmer une étude de dosimétrie pour déterminer les doses efficaces de chaque organe cible.

VI. Article

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging
https://doi.org/10.1007/s00259-019-04473-7

IMAGE OF THE MONTH

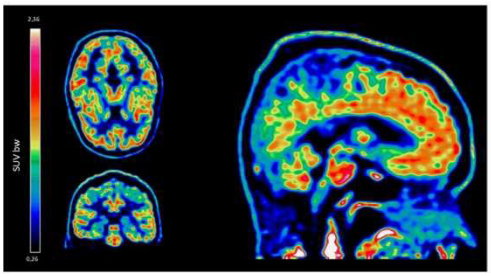
^{18}F-F13640 PET imaging of functional receptors in humans

Matthieu Colom[1,2] · Nicolas Costes[3] · Jérôme Redouté[3] · Frédéric Dailler[1] · Florent Gobert[1,2] · Didier Le Bars[1,3,4,5] · Thierry Billard[3,5] · Adrian Newman-Tancredi[6] · Luc Zimmer[1,2,3,4]

Received: 25 July 2019 / Accepted: 30 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

The vast majority of PET radiopharmaceuticals used for receptor neuroimaging are antagonists. This is particularly true for 5-HT$_{1A}$ receptor radiopharmaceuticals such as ^{18}F-MPPF or ^{11}C-WAY100635. These radiolabeled antagonists allow PET neuroimaging of the total pool of receptors, regardless of their functional state. In contrast, agonists bind preferentially to the functionally active state of receptors, a pharmacological property that has not yet been exploited for PET imaging of functional 5-HT$_{1A}$ receptors [1]. To this end, we have developed a highly selective 5-HT$_{1A}$ receptor agonist, ^{18}F-F13640, and validated it in animal models [2]. A postmortem study in Alzheimer subjects showed that the in vitro binding of ^{18}F-F13640 differs from that of ^{18}F-MPPF, the prototypical radiopharmaceutical [3].

Here we show the first human brain image obtained in vivo with ^{18}F-F13640 (study registration, EudraCT 2017-002722-21). A summed brain PET image was obtained in a 32-year-old healthy man after IV injection of the radiopharmaceutical (90-min scan). ^{18}F-F13640 brain distribution, expressed by the standardized uptake value with the body weight (SUV bw), showed a binding pattern different from that seen with conventional antagonist 5-HT$_{1A}$ radiopharmaceuticals. Although the binding regions are well correlated to the density of 5-HT$_{1A}$ receptors, the ROIs are mainly cortical, indicating that these brain regions are enriched in functionally active receptors.



^{18}F-F13640 is the first radiopharmaceutical that enables in vivo investigation of functional 5-HT$_{1A}$ receptors that are likely to be altered in pathological conditions such as neurodegenerative diseases or psychiatric disorders. The development of this agonist PET radiopharmaceutical opens new opportunities for nuclear medicine.

This article is part of the Topical Collection on Image of the month

✉ Luc Zimmer
luc.zimmer@univ-lyon1.fr

1 Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
2 Lyon Neuroscience Research Center, Bron, France
3 CERMEP-imaging platform, Lyon, France
4 Université de Lyon, Lyon, France
5 Institute of Chemistry and Biochemistry, Villeurbanne, France
6 Neurolixis Inc., Dana Point, USA

Acknowledgments This research was partly supported by AVIESAN, the French National Alliance for Life Sciences and Health; by the crowdfunding platform Thellie; by the Hospices Civils de Lyon; and by the imaging platform, CERMEP (Lyon, France).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent Written informed consent was obtained from the spouse of the subject for publication of this case report and accompanying images.

Published online: 14 August 2019

References

1. Zimmer L. Pharmacological agonists for more-targeted CNS radiopharmaceuticals. Oncotarget. 2016;7:80111–2.
2. Vidal B, Fieux S, Colom M, et al. ^{18}F-F13640 preclinical evaluation in rodent, cat and primate as a 5-HT_{1A} receptor agonist for PET neuroimaging. Brain Struct Funct. 2018;223:2973–88.
3. Vidal B, Sebti J, Verdurand M, et al. Agonist and antagonist bind differently to 5-HT1A receptors during Alzheimer's disease: a post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. Neuropharmacology. 2016;109:88–95.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CHAPITRE 8 : PERSPECTIVES

En prévision des prochaines études cliniques qui pourrait utiliser le [^{18}F]F13640 comme un outil inédit de pharmacologie, nous avons amorcé un projet de recherche visant à mieux comprendre la physiopathologie de l'algie vasculaire de la face (AVF ou cluster headache).

Pour cela, nous proposons dans le dernier chapitre le projet de recherche, son rationnel et son protocole détaillé sous la forme de la réponse à deux appels d'offres qui ont été sollicités avec succès : la fondation Neurodis (payant 50% du projet) et la fondation APICIL (payant les autres 50%).

Hybrid PET/MR imaging to explore Cluster Headache Pathophysiology

Keywords
PET/MR, 5-HT$_{1A}$ receptor, cluster headache, agonist

Project leader
Prof. Luc ZIMMER
luc.zimmer@univ-lyon1.fr; +33 6 79 25 23 28

Research team
Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon
(INSERM U1028, CNRS UMR5292, Université Claude Bernard Lyon 1)

Project participants
Dr. Geneviève DEMARQUAY, MD/PhD (Neurologist, CRNL & HCL)
Dr. Matthieu Colom, PharmD (Pharmacist & PhD student, CRNL & HCL)
Dr. Nicolas Costes, PhD (Research engineer, CERMEP)
Dr. Ines Merida, PhD (Research engineer, CERMEP)
Prof. Luc Zimmer, PharmD/PhD (Professor of pharmacology, CRNL & HCL & CERMEP)

I. What is Cluster Headache?

Cluster Headache (CH), also known as “suicide headache”, is one of the most painful types of headache. CH is a primary headache disorder defined by a stereotypical clinical presentation and a unique circadian and circannual rhythmicity. Attacks are characterized by severe or very severe, strictly unilateral orbital, supraorbital and/or temporal pain lasting from 15 to 180 minutes (291). Headache attacks are associated with ipsilateral cranial autonomic symptoms such as lacrimation, conjunctival injection, rhinorrhea. During active cluster periods, attacks may strike up to 8 times a day at predictable times of the day. In the episodic form of CH, active cluster periods last for weeks or months and usually occur at the same period of the year in the autumn or spring. Cluster periods are separated by pain-free periods lasting more than one month. Another specificity of this painful disorder is the age and gender distribution of patients. Typically, CH mostly affects men and the mean age of onset is about 30 years.

II. How serotonin (5-HT) is implicated in CH?

Despite the fact that numerous studies explored CH patients, the pathophysiological mechanisms underlying this painful disorder remain poorly understood. As compared with the pathophysiology of migraine, CH has some specific mechanisms (292). Brain structures thought to be involved in the pathophysiology of CH are the trigeminovascular and parasympathetic systems and the hypothalamus (293). However, the anatomical site of CH attack initiation and the pattern of activated brain regions during attacks remain unknown (294). Pharmacological experiments suggest that 5-HT plays a major role in CH attacks (295). One of the princeps studies revealed a low concentration of 5-HT in the whole blood and platelet outside the attack periods (296). Later, the levels of 5-HT and its metabolite 5-HIAA were found increased in plasma of CH patients during attaks, this was interpreted as the consequence of an enhanced serotoninergic metabolism (297). If these previous arguments are too indirect to be considered as definitive, implication of 5-HT in CH was also supported by the therapeutic impact of various agonist radioligands on 5-HT receptors such as ergot derivatives, and triptans (298). Here again, the pathophysiological concepts remain poorly documented and succinct. In addition, the pharmacological treatments currently available are of modest efficacy (299). All these elements justify the need to focus on specific targets in order to understand more precisely the CH mechanisms.

III. What is the role of 5-HT1A receptors in CH?

Extensive studies in rodents suggest that 5-HT modulates nociceptive responses through the stimulation of several receptor types, particularly 5-HT_{1A} receptors. Mutant mice, which do not express 5-HT_{1A} receptors compared to paired wild-type mice of the same genetic background, were examined using validated tests based on different sensory modalities (300) and revealed a correlation between the expression of the receptor and a pain behavior. In terms of clinical research, 5-HT1A receptors are involded in psycho-emotionnal symptoms such as anxiety and depression which are observed during migraine and CH attacks (301). 5-HT_{1A} receptors also mediate the antinociceptive effect of serotonin against extracranial pain (302) and are known to mediate addiction (303,304), a feature commonly observed in CH patients (305). However, these data do not directly demonstrate the role of 5-HT_{1A} receptor in CH, and innovative methods must be implemented for investigating the serotonergic system in the CH are warranted. Uncovering the serotonergic 5-HT_{1A} mechanisms in CH pathophysiology could prove useful for the development of future drugs,

IV. How can PET/MR neuroimaging help for understanding CH pathophysiology?

So far, the few neuroimaging studies that have focused on CH have been conducted mostly with fMRI and more rarely with positron emission tomography (PET) radiotracers e.g., [^{18}F]FDG and [^{15}O]H2O, limiting the exploration to glucose metabolism or cerebral blood flow, respectively (306). As a main result, both PET and MRI demonstrated the implication of posterior hypothalamic region and anterior cingular cortex in critical phase (307,308).

In this study, two innovative technologies will be used: 1) simultaneous acquisition of PET and MR images with a hybrid device available in Lyon, which permits to combine 5-HT1A receptors exploration, activation and functional connectivity studies; 2) the use for PET study of the first 5-HT_{1A} radiopharmaceutical, [^{18}F]F13640, which is a pure agonist binding specifically the functional receptors, developed by our team in the CERMEP-platform (EU Clinical Trials Register, EudraCT number #2016-00016-15). This will permit for the first time to assess the distribution of functional 5-HT_{1A} receptors in the different phases of the CH attack.

V. Specific aims

The aim of this study is to investigate simultaneously the modifications of functional 5-HT_{1A} receptor coupling in CH patients vs the modifications of fMRI patterns during pain free periods and during attaks.

VI. Methods

As summarized in Figure 57, we will compare the binding profiles of [18F]F13640 in CH patients and control subjects and correlate the density of functional receptors with the fMRI pattern at resting state, before, during and after an attack, and following administration of sumatriptan, a 5-HT1A agonist efficient to block CH attacks. As CH attack occur everyday at the same time during the active period, we elaborated a versatile protocol which addresses several physiopathological questions in each phase of CH. The latin square design of the study has the advantage to permit multiple comparisons. Finally, the introduction in the active phase of sumatriptan, provides the opportunity to decipher the mechanism of its therapeutic effect on CH.

VII. Expected results

We expect that specific 5-HT_{1A} receptor status will correlate with brain activation patterns and that these parameters will be different between control subjects and CH patients in the pain free period, and will show changes between basal states during pain free and cluster headache periods, as well as between no-pain status, before an attack or after sumatriptan administration, and headache attack in CH patients. The regional modifications of "functional" 5-HT1A receptors over the course of CH will contribute to the understanding of the neurobiological support of this disabling neurological disorder and will argue in favour of the role of this receptor as a therapeutic target.

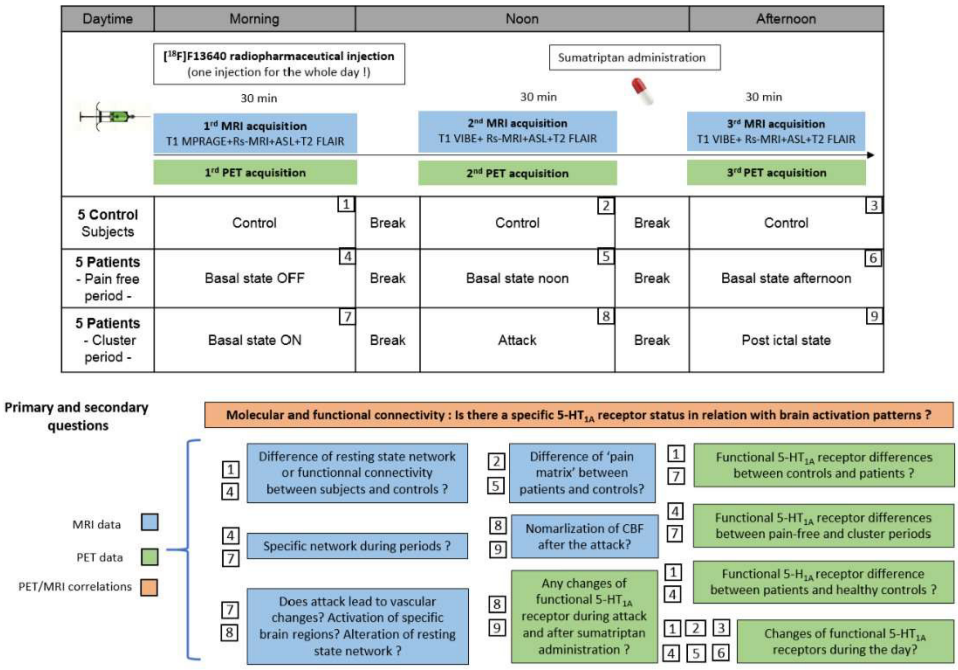


Figure 57: summary of the experimental protocol and the questions we can answer through PET/MT imaging.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans ce travail de thèse, nous avons tenté de montrer dans quelle mesure les radiotraceurs agonistes revisitent la neuropharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G. Nous avons montré que la mesure de libération de neurotransmetteurs endogène en TEP était une modalité très recherchée pour ses applications potentielles dans l'exploration des désordres neurologiques et psychiatriques.

Les premières études réalisées avec les radiotraceurs dopaminergiques invitent à repenser le modèle ligand récepteur. En effet, les radiotraceurs agonistes dopaminergiques sont apparus plus sensibles que leurs homologues antagonistes. Il a donc fallu intégrer les données *in vitro* de la pharmacologie des protéines G *in vivo* pour expliquer ces différences. Sous l'angle d'une recherche bibliographique, nous avons montré que les phénomènes d'internalisation, d'agonisme biaisé, de couplage s'appliquent uniquement aux radiotraceurs agonistes. Par ailleurs, *in vitro*, les radiotraceurs agonistes se lient avec une haute affinité aux récepteurs couplés alors que les radiotraceurs antagonistes se lient avec la même affinité aux récepteurs couplés et non couplés. Cette propriété fondamentale semble expliquer pourquoi les radiotraceurs agonistes sont plus sensibles que les radiotraceurs antagonistes pour mesurer la libération de neurotransmetteurs. Vu les propriétés qui leur sont associées, il est possible d'obtenir une image fonctionnelle des récepteurs couplés aux protéines G.

Dans le prisme du développement d'un nouveau radiotraceur agoniste 5-HT_{1A} , nous avons exploré ces propriétés. Alors qu'aucun radiotraceur antagoniste ne montrait une sensibilité à la sérotonine, nous avons démontré la sensibilité du [^{18}F]F13640. Cela confirme le concept selon lequel le radiotraceur agoniste présente un avantage certain pour mesurer des fluctuations endogènes de neurotransmetteurs.

Devant la spécificité, la sélectivité du [^{18}F]F13640 et ses études précliniques encourageantes, nous avons réalisé son premier passage à l'homme en proposant de façon inédite la première imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels. Ce travail rappelle aussi l'importance de comparer l'imagerie d'un radiotraceur antagoniste et d'un radiotraceur agoniste pour apporter des preuves de concepts et améliorer le modèle ligand récepteur couplés aux protéines G. On comprend que les radiotraceurs agonistes ouvrent les portes de la pharmacologie fonctionnelle et invitent à utiliser des techniques d'imagerie hybrides (TEP/IRM) pour consolider cette approche.

Enfin, au regard du Chapitre 1 définissant les étapes du développement du radiotraceur TEP, nous proposons ici un récapitulatif des étapes réalisées pour le [^{18}F]F13640.

PHASE INITIALE	
Question biomédicale	Peut-on voir en imagerie TEP le couplage des récepteurs couplés aux protéines G ?
Cible biologique	Récepteurs 5-HT_{1A}
Molécules	série des F : F13714, F15599, F13640
Synthèse radiochimique	Substitution nucléophile, ajout d'un ^{18}F
PHASE PRECLINIQUE	
Evaluation de la bibliothèque de radiotraceur : série des F	[^{18}F]F13714 liaison irréversible : arrêt [^{18}F]F15599 signal/bruit trop important : arrêt [^{18}F]F13640 valide sur modèle rat, primate, chat
Modélisation pharmacocinétique	Echec de la modélisation sur le modèle rat Pas de métabolites chez le rat
Preuve de concept en autoradiographie	Blocage dose -dépendant par sérotonine et blocage par WAY-100635 chez le rat Liaison aux récepteurs couplés chez le rat et le chat montré avec le GPP(NH)p Diminution dose dépendante de la liaison *ex vivo* après défi pharmacologique à la fenfluramine chez le rat
Etudes TEP	Blocage par 8-OHDPAT chez le rat et le chat Blocage par WAY-100635 chez le rat, le chat et le primate Agonisme biaisé du F13640 par imagerie Hybride TEP/IRM chez le chat Sensibilité du [^{18}F]F13640 à la libération de sérotonine chez le chat en condition de pré-traitement et défi pharmacologique induit par fenfluramine
PHASE CLINIQUE	
Autoradiographie	Diminution du couplage des récepteurs en phase précoce de la MA
Etude TEP	Premier passage à l'homme en cours -Acquisition des premières données de biodistribution -Pas de métabolites -Modélisation en cours
Perspectives	Exploration de l'Algie Vasculaire de la Face en TEP/IRM

Tableau 12 : résumé des études [^{18}F]F13640 pour l'imagerie des récepteurs 5HT_{1A} couplés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Regards sur l'histoire de l'imagerie médicale [Internet]. Disponible sur: http://www.citesciences.fr/fr/ressources/bibliotheque-en-ligne/regards sur/regards-sur-lhistoire-delimagerie-medicale/limagerie-nucleaire/

2. Jarritt PH, Acton PD. PET imaging using gamma camera systems: a review. Nucl Med Commun. sept 1996;17(9):758-66.

3. PIPAME. Imagerie Médicale du Futur [Internet]. 2013. Disponible sur: https://competitivite.gouv.fr/fileadmin/DOCUMENTS/Etudes_et_rapports/Imagerie-medicale-futur_Octobre_2013.pdf

4. Brownell G. A HISTORY OF POSITRON IMAGING. Celebration of the 50th Year of Services to the Massachusetts General Hospital, Cambridge, MA. 15 oct 1999;

5. Roy CS, Sherrington CS. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. J Physiol. janv 1890;11(1-2):85-158.17.

6. Shorter E. Book Review: Naked to the Bone: Medical Imaging in the Twentieth Century. Bull Hist Med. 1998;72(1):165-6.

7. Squirre larry. The History of Neuroscience in Autobiography. Vol. 1. 1996.

8. Wagner H, Burns H, Dannals R, Wong D, Langstrom B, Duelfer T, et al. Imaging dopamine receptors in the human brain by positron tomography. Science. 23 sept 1983;221(4617):1264-6.

9. Blahd WH. Benedict Cassen The Father of Body Organ Imaging. Cancer Biother Radiopharm. oct 2000;15(5):423-9.

10. Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. Trends Pharmacol Sci. sept 2010;31(9):411-7.

11. Honer M, Gobbi L, Martarello L, Comley RA. Radioligand development for molecular imaging of the central nervous system with positron emission tomography. Drug Discov Today. déc 2014;19(12):1936-44.

12. Van de Bittner GC, Ricq EL, Hooker JM. A Philosophy for CNS Radiotracer Design. Acc Chem Res. 21 oct 2014;47(10):3127-34.

13. Wagner HN. Brain imaging: the chemistry of mental activity. London: Springer; 2009. 244 p.

14. Kießling F, Pichler B, éditeurs. Small animal imaging: basics and practical guide. 1. ed. Heidelberg: Springer; 2011. 597 p.

15. Sjögren B. The evolution of regulators of G protein signalling proteins as drug targets - 20 years in the making: IUPHAR Review 21: Evolution of RGS proteins as drug targets. Br J Pharmacol. mars 2017;174(6):427-37.

16. Nollert P, Stewart L. Climbing Mount Everest, the GPCR way. Drug Discov Today TARGETS. févr 2004;3(1):2-4.

17. Rebois RV, Allen BG, Hébert TE. The targetable G protein proteome: where is the next generation of drug targets? Drug Discov Today TARGETS. juin 2004;3(3):104-11.

18. Narendran R, Frankle W, Mason N, Laymon C, Lopresti B, Price J, et al. Positron emission tomography imaging of D 2/3 agonist binding in healthy human subjects with the radiotracer. C] N, éditeur. Synapse. 2009;63:574–584.

19. Gage D, Voytko ML, Ehrenkaufer RLE, Tobin JR, Efange SMN, Mach RH. Reproducibility of Repeated Measures of Cholinergic Terminal Density Using [18F](+)-4-Fluorobenzyltrozamicol and PET in the Rhesus Monkey Brain. 2000;41(12):2069-76.

20. Seo YJ, Kang Y, Muench L, Reid A, Caesar S, Jean L, et al. Image-Guided Synthesis Reveals Potent Blood-Brain Barrier Permeable Histone Deacetylase Inhibitors. ACS Chem Neurosci. 16 juill 2014;5(7):588-96.

21. Wang C, Eessalu TE, Barth VN, Mitch CH, Wagner FF, Hong Y, et al. Design, synthesis, and evaluation of hydroxamic acid-based molecular probes for in vivo imaging of histone deacetylase (HDAC) in brain. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2013;4(1):29-38.

22. Stephenson K, Vanoosten E, Wilson A, Meyer J, Houle S, Vasdev N. Synthesis and preliminary evaluation of [18F]-fluoro-(2S)-Exaprolol for imaging cerebral β-adrenergic receptors with PET. Neurochem Int. nov 2008;53(5):173-9.

23. Neelamegam R, Hellenbrand T, Schroeder FA, Wang C, Hooker JM. Imaging Evaluation of $5HT_{2C}$ Agonists, [^{11} C]WAY-163909 and [^{11} C]Vabicaserin, Formed by Pictet–Spengler Cyclization. J Med Chem. 27 févr 2014;57(4):1488-94.

24. Horti AG, Gao Y, Kuwabara H, Dannals RF. Development of radioligands with optimized imaging properties for quantification of nicotinic acetylcholine receptors by positron emission tomography. Life Sci. avr 2010;86(15-16):575-84.

25. Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA. Molecular Imaging with PET. Chem Rev. mai 2008;108(5):1501-16.

26. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3–25. 1. Adv Drug Deliv Rev. mars 2001;46(1-3):3-26.

27. Eckelman WC. The use of PET and knockout mice in the drug discovery process. Drug Discov Today. 1 mai 2003;8(9):404-10.

28. Long NJ, Wong W-T, éditeurs. The chemistry of molecular imaging. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2015. 395 p.

29. Le cyclotron Arronax, un nouvel accélérateur pour la recherche [Internet]. Handicapinfos.com. Disponible sur: http://www.handicapinfos.com/informer/cyclotron-arronax-nouvelaccelerateurrecherche_8371.htm

30. Lee E, Kamlet AS, Powers DC, Neumann CN, Boursalian GB, Furuya T, et al. A fluoride-derived electrophilic late-stage fluorination reagent for PET imaging. Science. 4 nov 2011;334(6056):639-42.

31. Delforge J, Syrota A, Mazoyer BM. Identifiability analysis and parameter identification of an in vivo ligand-receptor model from PET data. IEEE Trans Biomed Eng. juill 1990;37(7):653-61.

32. Delforge J, Syrota A, Mazoyer BM. Experimental design optimisation: theory and application to estimation of receptor model parameters using dynamic positron emission tomography. Phys Med Biol. 1 avr 1989;34(4):419-35.

33. Gunn RN, Gunn SR, Cunningham VJ. Positron Emission Tomography Compartmental Models. J Cereb Blood Flow Metab. juin 2001;21(6):635-52.

34. Ichise M, Meyer JH, Yonekura Y. An introduction to PET and SPECT neuroreceptor quantification models. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. mai 2001;42(5):755-63.

35. Delforge J. Mesure in vivo de la concentration de récepteurs par la modélisation des interactions ligand-récepteur. Immuno-Anal Biol Spéc. janv 1996;11(3):152-60.

36. Costes N. Neurotransmission sérotoninergique 5-HT1A : approche méthodologique de la mesure in vivo par le [18F]MPPF en tomographie par émission de positons [Thèse de doctorat en neurologie]. [Lyon (France)]: Université Claude Bernard Lyon 1; 2007.

37. Innis RB, Cunningham VJ, Delforge J, Fujita M, Gjedde A, Gunn RN, et al. Consensus Nomenclature for *in vivo* Imaging of Reversibly Binding Radioligands. J Cereb Blood Flow Metab. sept 2007;27(9):1533-9.

38. PMOD Kinetic Modeling (PKIN) [Internet]. Disponible sur: http://doc.pmod.com/PDF/PKIN.pdf

39. Logan J. Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers. Nucl Med Biol. oct 2000;27(7):661-70.

40. Hume SP, Lammertsma AA, Myers R, Rajeswaran S, Bloomfield PM, Ashworth S, et al. The potential of high-resolution positron emission tomography to monitor striatal dopaminergic function in rat models of disease. J Neurosci Methods. août 1996;67(2):103-12.

41. Mintun MA, Raichle ME, Kilbourn MR, Wooten GF, Welch MJ. A quantitative model for the in vivo assessment of drug binding sites with positron emission tomography. Ann Neurol. mars 1984;15(3):217-27.

42. Huang S-C, Feng D, Phelps ME. Model Dependency and Estimation Reliability in Measurement of Cerebral Oxygen Utilization Rate with Oxygen-15 and Dynamic Positron Emission Tomography. J Cereb Blood Flow Metab. févr 1986;6(1):105-19.

43. Wong D, Wagner H, Tune L, Dannals R, Pearlson G, Links J, et al. Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. Science. 19 déc 1986;234(4783):1558-63.

44. Patlak CS, Blasberg RG. Graphical Evaluation of Blood-to-Brain Transfer Constants from Multiple-Time Uptake Data. Generalizations. J Cereb Blood Flow Metab. déc 1985;5(4):584-90.

45. Laruelle M. Positron emission tomography: imaging and quantification of neurotrasnporter availability. 2002;27(3):287-99.

46. Jouvie C. Estimation de la fonction d'entrée en Tomographie par Emission de Positons. [Thèse de Doctorat d'Université, Physique]. [Paris, France]: Université Paris Sud - ¨Paris XI; 2013.

47. Delforge J, Pappata S, Millet P, Samson Y, Bendriem B, Jobert A, et al. Quantification of Benzodiazepine Receptors in Human Brain Using PET, [^{11} C]Flumazenil, and a Single-Experiment Protocol. J Cereb Blood Flow Metab. mars 1995;15(2):284-300.

48. Fleming IN, Whelan M, Baxendale R, Gilbert FJ, Matthews PP, Aigbirhio FI. Positron emission tomography radiopharmaceutical studies in humans: a guide to regulations for academic researchers. Nucl Med Commun. sept 2012;33(9):899-906.

49. Verbruggen A, Coenen HH, Deverre J-R, Guilloteau D, Langstrom B, Salvadori PA, et al. Guideline to regulations for radiopharmaceuticals in early phase clinical trials in the EU. Eur J Nucl Med Mol Imaging. nov 2008;35(11):2144-51.

50. Mosessian S, Duarte-Vogel SM, Stout DB, Roos KP, Lawson GW, Jordan MC, et al. INDs for PET Molecular Imaging Probes—Approach by an Academic Institution. Mol Imaging Biol. août 2014;16(4):441-8.

51. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA. 27 nov 2013;310(20):2191.

52. FDA. Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals [Internet]. 2010. Disponible sur: http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073246.pdf

53. I.C.R.P. Radiological Protection in Biomedical Research. ICRP Publ 62 Ann ICRP. 1992;22(3).

54. The Radiopharmacy Committee of the EANM, Elsinga P, Todde S, Penuelas I, Meyer G, Farstad B, et al. Guidance on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. Eur J Nucl Med Mol Imaging. mai 2010;37(5):1049-62.

55. European Union. Regulation (EU) No 536/2014 of the European Parliament and ofthe Council of 16 April 2014 on clinical trials on medicinal products for human use and repealing. L 1–76. [Internet]. 2014. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/human-use/clinical-trials/regulation_en

56. Guidelines to good manufacturing practice medicinal products for human and veterinary use; part II basic requirements for active substances used as starting materials. 2005. (Eudralex: The Rules Governing Medicinal Products in the European Union; vol. 4).

57. Huang Y, Carson R. Positron Emission Tomography Imaging: A Quantitative Biomarker in CNS Drug Development [Internet]. Positron Emission Tomography Imaging: A Quantitative Biomarker in CNS Drug Development. 2012. Disponible sur: http://www.petcenter.yale.edu/2012-Huang-CarsonAm%20PharmRev-CNS-Drug-Devel_132856_284_5.pdf

58. Cunningham VJ, Rabiner EA, Slifstein M, Laruelle M, Gunn RN. Measuring Drug Occupancy in the Absence of a Reference Region: The Lassen Plot Re-Visited. J Cereb Blood Flow Metab. janv 2010;30(1):46-50.

59. Finnema SJ, Scheinin M, Shahid M, Lehto J, Borroni E, Bang-Andersen B, et al. Application of cross-species PET imaging to assess neurotransmitter release in brain. Psychopharmacology (Berl). nov 2015;232(21-22):4129-57.

60. Mullard A. Molecular imaging as a de-risking tool: coming into focus? Nat Rev Drug Discov. avr 2013;12(4):251-2.

61. Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS. Molecular imaging in drug development. Nat Rev Drug Discov. juill 2008;7(7):591-607.

62. Matthews PM, Rabiner EA, Passchier J, Gunn RN. Positron emission tomography molecular imaging for drug development: PET for drug development. Br J Clin Pharmacol. févr 2012;73(2):175-86.

63. Piel M, Vernaleken I, Rösch F. Positron Emission Tomography in CNS Drug Discovery and Drug Monitoring. J Med Chem. 26 nov 2014;57(22):9232-58.

64. Bergstrom M, Grahnen A, Lingstrom B. Positron emission tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development. Eur J Clin Pharmacol. 1 sept 2003;59(5-6):357-66.

65. Lappin G, Garner RC. Big physics, small doses: the use of AMS and PET in human microdosing of development drugs. Nat Rev Drug Discov. mars 2003;2(3):233-40.

66. EMEA. Position paper on non clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose [Internet]. 2003. Disponible sur: http://www.iaa-ams.co.jp/img_bsnss/MD1.pdf

67. Combes RD, Berridge T, Connelly J, Eve MD, Garner RC, Toon S, et al. Early microdose drug studies in human volunteers can minimise animal testing: Proceedings of a workshop organised by Volunteers in Research and Testing. Eur J Pharm Sci. mai 2003;19(1):1-11.

68. Uhl P, Fricker G, Haberkorn U, Mier W. Radionuclides in drug development. Drug Discov Today. févr 2015;20(2):198-208.

69. Nikolaus S, Antke C, Müller H-W. In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: II. Mental and affective disorders. Behav Brain Res. déc 2009;204(1):32-66.

70. van Gool AJ, Henry B, Sprengers ED. From biomarker strategies to biomarker activities and back. Drug Discov Today. févr 2010;15(3-4):121-6.

71. Département pédagogique de pharmacologie. Pharmacologie moléculaire. Lyon (France): ISPB; 2011.

72. Lebon G, Tate CG. Les récepteurs couplés aux protéines G dans la lumière. médecine/sciences. oct 2012;28(10):876-82.

73. Martins S, Trabuco J, Monteiro G, Prazeres D. GPCR screening and drug discovery: Challenges and latest trends. European Pharmaceutical Review. 17(2):57-62.

74. Hamon M, Gozlan H. Les récepteurs centraux de la sérotonine. 1993;9:21-30.

75. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. β-Arrestins and Cell Signaling. Annu Rev Physiol. mars 2007;69(1):483-510.

76. Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci. août 2007;28(8):397-406.

77. Dror RO, Arlow DH, Borhani DW, Jensen MO, Piana S, Shaw DE. Identification of two distinct inactive conformations of the 2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. Proc Natl Acad Sci. 24 mars 2009;106(12):4689-94.

78. Westerink BHC, Cremers TIFH, éditeurs. Handbook of microdialysis: methods, applications and perspectives. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2007. 697 p. (Handbook of behavioral neuroscience).

79. Farde L, Nordström AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. Arch Gen Psychiatry. juill 1992;49(7):538-44.

80. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Schlyer D, Hitzemann R, et al. Imaging endogenous dopamine competition with [11C]raclopride in the human brain. Synap N Y N. avr 1994;16(4):255-62.

81. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Rosenblatt W, Zea-Ponce Y, Zoghbi SS, et al. SPECT imaging of striatal dopamine release after amphetamine challenge. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. juill 1995;36(7):1182-90.

82. Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M, et al. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. Am J Psychiatry. juin 1998;155(6):761-7.

83. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A. 5 juill 2000;97(14):8104-9.

84. Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. Proc Natl Acad Sci U S A. 18 mars 1997;94(6):2569-74.

85. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, et al. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. Proc Natl Acad Sci U S A. 20 août 1996;93(17):9235-40.

86. Laruelle M, Huang Y. Vulnerability of positron emission tomography radiotracers to endogenous competition. New insights. Q J Nucl Med Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharmacol IAR. juin 2001;45(2):124-38.

87. Hwang D, Narendran R, Hwang Y, Slifstein M, Talbot P, Sudo Y, et al. Quantitative Analysis of ()-N-11C-Propyl-Norapomorphine In Vivo Binding in NonhumanPrimates. J Nucl Med. 2004;45:338–346.

88. Hwang D, Narendran R, and Laruelle M. Positron-Labeled Dopamine Agonists for Probing the High Affinity States of Dopamine Subtype 2 Receptors. Bioconjugate Chem. 2005;16:27–31.

89. Laruelle M. Imaging synaptic neurotransmission with in vivo binding competition techniques: A critical review. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:423–451.

90. Colom M, Vidal B, Zimmer L. Is There a Role for GPCR Agonist Radiotracers in PET Neuroimaging? Front Mol Neurosci. 2019;12:255.

91. Shalgunov V, van Waarde A, Booij J, Michel MC, Dierckx RAJO, Elsinga PH. Hunting for the high-affinity state of G-protein-coupled receptors with agonist tracers: Theoretical and practical considerations for positron emission tomography imaging. Med Res Rev. mai 2019;39(3):1014-52.

92. Zimmer L. Pharmacological agonists for more-targeted CNS radio-pharmaceuticals. Oncotarget [Internet]. 6 déc 2016 [cité 11 déc 2018];7(49). Disponible sur: http://www.oncotarget.com/fulltext/13418

93. Laruelle M, Iyer RN, al-Tikriti MS, Zea-Ponce Y, Malison R, Zoghbi SS, et al. Microdialysis and SPECT measurements of amphetamine-induced dopamine release in nonhuman primates. Synap N Y N. janv 1997;25(1):1-14.

94. Endres CJ, Kolachana BS, Saunders RC, Su T, Weinberger D, Breier A, et al. Kinetic modeling of [11C]raclopride: combined PET-microdialysis studies. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. sept 1997;17(9):932-42.

95. Green AL, McGachy HA. The inhibition of monoamine oxidase by tricyclic antidepressants: the influence of the nature of the substrate and the source of the enzyme. J Pharm Pharmacol. mai 1987;39(5):392-4.

96. Uretsky NJ, Snodgrass SR. Studies on the mechanism of stimulation of dopamine synthesis by amphetamine in striatal slices. J Pharmacol Exp Ther. sept 1977;202(3):565-80.

97. Shalgunov D. Development of 18F-labeled agonist radioligands for PET imaging of the high-affinity state of cerebral dopamine D2/3 receptors [Master's thesis]. [Netherlands]: University of Gröningen; 2017.

98. Hartvig P, Torstenson R, Tedroff J, Watanabe Y, Fasth KJ, Bjurling P, et al. Amphetamine effects on dopamine release and synthesis rate studied in the Rhesus monkey brain by positron emission tomography. J Neural Transm Vienna Austria 1996. 1997;104(4-5):329-39.

99. Chugani D, Ackermann R, and Phelps M. In Vivo [3H]Spiperone Binding: Evidence for Accumulation in Corpus Striatum by Agonist-Mediated Receptor Internalization. J Cereb Blood Flow Metab. 1988;8:291–303.

100. Narendran R, Slifstein M, Guillin O, Hwang Y, Hwang D, Scher E, et al. Dopamine (D2/3) receptor agonist positron emission tomography radiotracer [11C](+)-PHNO is a D3 receptor preferring agonist in vivo. Synapse. 2006;60:485–495.

101. Yokoyama C, Mawatari A, Kawasaki A, Takeda C, Onoe K, Doi H, et al. Marmoset Serotonin 5-HT $_{1A}$ Receptor Mapping with a Biased Agonist PET Probe ^{18} F-F13714: Comparison with an Antagonist Tracer ^{18} F-MPPF in Awake and Anesthetized States. Int J Neuropsychopharmacol. déc 2016;19(12):pyw079.

102. Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. The human serotonin1A receptor exhibits G-protein-dependent cell surface dynamics. Glycoconj J. janv 2007;24(1):25-31.

103. Paterson LM, Tyacke RJ, Nutt DJ, Knudsen GM. Measuring endogenous 5-HT release by emission tomography: promises and pitfalls. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. oct 2010;30(10):1682-706.

104. Berg KA, Clarke WP. Development of functionally selective agonists as novel therapeutic agents. Drug Discov Today Ther Strateg. déc 2006;3(4):421-8.

105. Kenakin T. New Lives for Seven Transmembrane Receptors as Drug Targets. Trends Pharmacol Sci. nov 2015;36(11):705-6.

106. Luttrell LM, Maudsley S, Bohn LM. Fulfilling the Promise of « Biased » G Protein-Coupled Receptor Agonism. Mol Pharmacol. sept 2015;88(3):579-88.

107. Rankovic Z, Brust TF, Bohn LM. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. Bioorg Med Chem Lett. janv 2016;26(2):241-50.

108. Dorange I. Editorial (Thematic Issue: New Paradigms in GPCR Drug Discovery). Curr Top Med Chem. 29 août 2015;15(24):2475-2475.

109. Jacobson KA. New paradigms in GPCR drug discovery. Biochem Pharmacol. déc 2015;98(4):541-55.

110. Sposini S, Hanyaloglu AC. Evolving View of Membrane Trafficking and Signaling Systems for G Protein-Coupled Receptors. In: Lamaze C, Prior I, éditeurs. Endocytosis and Signaling [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cité 28 mars 2020]. p. 273-99. (Progress in Molecular and Subcellular Biology; vol. 57). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-96704-2_10

111. Schaffhausen J. What Precisely Is Precision Medicine? Trends Pharmacol Sci. janv 2017;38(1):1-2.

112. DaSilva J, Wilson A, Nobrega J, Jiwa D, and Houle S. Synthesis and autoradiographic localization of the dopamine D-1. Appl Radiat Isot. 1996;47:279–284.

113. DaSilva J, Wilson A, Valante M, C. H, D. W, D., et al. In vivo binding. 11CSKF 75670 11CSKF 82957 Rat Brain Two Dopamine. 1996;58:1661–1670.

114. DaSilva J, Schwartz R, Greenwald E, Lourenco C, Wilson A, and Houle S. Dopamine D1 agonist R-[11C]SKF 82957: synthesis and in vivo characterization in rats. Nucl Med Biol. 1999;26:537–542.

115. Palner M, McCormick P, Parkes J, Knudsen G, and Wilson A. Systemic catechol-O-methyl transferase inhibition enables the D1 agonist radiotracer R-[11C]SKF 82957. Nucl Med Biol. 2010;37:837–843.

116. Vangveravong S, Zhang Z, Taylor M, Bearden M, Xu J, Cui J, et al. Synthesis and characterization of selective dopamine D2 receptor ligands using aripiprazole as the lead compound. Bioorg Med Chem. 2011;19:3502–3511.

117. Xu J, Vangveravong S, Li S, Fan J, Jones L, Cui J, et al. Positron emission tomography imaging of dopamine D2 receptors using a highly selective radiolabeled D2 receptor partial agonist. NeuroImage. 2013;71:168–174.

118. Shi B, Narayanan T, Yang Z, Christian B, and Mukherjee J. Radiosynthesis and in vitro evaluation of 2-(N-alkyl-N-1'-11C-propyl)amino-5-hydroxytetralin analogs as high affinity agonists for dopamine D-2 receptors. Nucl Med Biol. 1999;26:725–735.

119. Mukherjee J, Narayanan T, Christian B, Shi B, and Yang Z. Binding characteristics of high-affinity dopamine D2/D3 receptor agonists,11C-PPHT and11C-ZYY-339 in rodents and imaging in non-human primates by PET. Synapse. 2004;54:83–91.

120. Shi B, Narayanan T, Christian B, Chattopadhyay S, and Mukherjee J. Synthesis and biological evaluation of the binding of dopamine D2/D3 receptor agonist, (R,S)-5-hydroxy-2-(N-propyl-N-(5'-18F-fluoropentyl)aminotetralin (18F-5-OH-FPPAT) in rodents and nonhuman primates. Nucl Med Biol. 2004;31:303–311.

121. Mukherjee J, Majji D, Kaur J, Constantinescu CC, Narayanan TK, Shi B, et al. PET radiotracer development for imaging high-affinity state of dopamine D2 and D3 receptors: Binding studies of fluorine-18 labeled aminotetralins in rodents: MUKHERJEE ET AL . Synapse. mars 2017;71(3):e21950.

122. Mewshaw R, Kavanagh J, Stack G, Marquis K, Shi X, Kagan M, et al. New Generation Dopaminergic Agents. 1. Discovery of a Novel Scaffold Which Embraces the D 2 Agonist Pharmacophore. Structure−Activity Relationships of a Series of 2-(Aminomethyl)chromans. J Med Chem. 1997;40:4235–4256.

123. Shalgunov V, van Wieringen J-P, Janssen HM, Fransen PM, Dierckx RAJO, Michel MC, et al. Synthesis and evaluation in rats of homologous series of [18F]-labeled dopamine D2/3 receptor agonists based on the 2-aminomethylchroman scaffold as potential PET tracers. EJNMMI Res [Internet]. déc 2015 [cité 11 déc 2018];5(1). Disponible sur: http://www.ejnmmires.com/content/5/1/41

124. van Wieringen J-P, Shalgunov V, Janssen HM, Fransen PM, Janssen AGM, Michel MC, et al. Synthesis and Characterization of a Novel Series of Agonist Compounds as Potential Radiopharmaceuticals for Imaging Dopamine $D_{2/3}$ Receptors in Their High-Affinity State. J Med Chem. 23 janv 2014;57(2):391-410.

125. Finnema S, Stepanov V, Nakao R, Sromek A, Zhang T, Neumeyer J, et al. 18F-Labeled Dopamine D2 and D3 Receptor Agonist Sensitive to Dopamine: A Preliminary PET Study. J Nucl Med. 2014;55:1164–1170.

126. Sromek A, Si Y, Zhang T, George S, Seeman P, and Neumeyer J. Synthesis and Evaluation of Fluorinated Aporphines: Potential Positron Emission Tomography Ligands for D 2 Receptors. ACS Med. Chem Lett. 2011;2:189–194.

127. Kumar JSD, Majo VJ, Hsiung S-C, Millak MS, Liu K-P, Tamir H, et al. Synthesis and in Vivo Validation of [*O* -Methyl- ^{11} C]2-{4-[4-(7-methoxynaphthalen-1-yl)piperazin- 1-yl]butyl}-4-methyl-2 *H* -[1,2,4]triazine-3,5-dione: A Novel 5-HT $_{1A}$ Receptor Agonist Positron Emission Tomography Ligand. J Med Chem. janv 2006;49(1):125-34.

128. Kumar JSD, Prabhakaran J, Majo VJ, Milak MS, Hsiung S-C, Tamir H, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a novel 5-HT1A receptor agonist radioligand [O-methyl-11C]2-(4-(4-(2-

methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-methyl-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)dione in nonhuman primates. Eur J Nucl Med Mol Imaging. juill 2007;34(7):1050-60.

129. Milak MS, Severance AJ, Ogden RT, Prabhakaran J, Kumar JSD, Majo VJ, et al. Modeling Considerations for 11C-CUMI-101, an Agonist Radiotracer for Imaging Serotonin 1A Receptor In Vivo with PET. J Nucl Med. 1 avr 2008;49(4):587-96.

130. Milak MS, DeLorenzo C, Zanderigo F, Prabhakaran J, Kumar JSD, Majo VJ, et al. In Vivo Quantification of Human Serotonin 1A Receptor Using 11C-CUMI-101, an Agonist PET Radiotracer. J Nucl Med. 1 déc 2010;51(12):1892-900.

131. Milak MS, Severance AJ, Prabhakaran J, Kumar JD, Majo VJ, Ogden RT, et al. *In vivo* Serotonin-Sensitive Binding of [^{11} C]CUMI-101: A Serotonin 1A Receptor Agonist Positron Emission Tomography Radiotracer. J Cereb Blood Flow Metab. janv 2011;31(1):243-9.

132. Pinborg LH, Feng L, Haahr ME, Gillings N, Dyssegaard A, Madsen J, et al. No change in [11C]CUMI-101 binding to 5-HT1A receptors after intravenous citalopram in human. Synapse. oct 2012;66(10):880-4.

133. Selvaraj S, Turkheimer F, Rosso L, Faulkner P, Mouchlianitis E, Roiser JP, et al. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission in humans: a [11C]CUMI-101 PET challenge study. Mol Psychiatry. déc 2012;17(12):1254-60.

134. Kumar JSD, Milak MS, Majo VJ, Prabhakaran J, Mali P, Savenkova L, et al. Comparison of High and Low Affinity Serotonin 1A Receptors by PET In Vivo in Nonhuman Primates. J Pharmacol Sci. 2012;120(3):254-7.

135. Hendry N, Christie I, Rabiner EA, Laruelle M, Watson J. In vitro assessment of the agonist properties of the novel 5-HT1A receptor ligand, CUMI-101 (MMP), in rat brain tissue. Nucl Med Biol. févr 2011;38(2):273-7.

136. Shrestha SS, Liow J-S, Lu S, Jenko K, Gladding RL, Svenningsson P, et al. 11C-CUMI-101, a PET Radioligand, Behaves as a Serotonin 1A Receptor Antagonist and Also Binds to 1 Adrenoceptors in Brain. J Nucl Med. 1 janv 2014;55(1):141-6.

137. Selvaraj S, Mouchlianitis E, Faulkner P, Turkheimer F, Cowen PJ, Roiser JP, et al. Presynaptic Serotoninergic Regulation of Emotional Processing: A Multimodal Brain Imaging Study. Biol Psychiatry. 15 oct 2015;78(8):563-71.

138. Selvaraj S, Walker C, Arnone D, Cao B, Faulkner P, Cowen PJ, et al. Effect of Citalopram on Emotion Processing in Humans: A Combined 5-HT1A [11C]CUMI-101 PET and Functional MRI Study. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol. 2018;43(3):655-64.

139. Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman-Tancredi A, et al. [18F]F15599, a novel 5-HT1A receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. mars 2010;37(3):594-605.

140. Majo VJ, Milak MS, Prabhakaran J, Mali P, Savenkova L, Simpson NR, et al. Synthesis and in vivo evaluation of [(18)F]2-(4-(4-(2-(2-fluoroethoxy)phenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-methyl-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)-dione ([(18)F]FECUMI-101) as an imaging probe for 5-HT1A receptor agonist in nonhuman primates. Bioorg Med Chem. 1 sept 2013;21(17):5598-604.

141. Shrestha SS, Liow J-S, Jenko K, Ikawa M, Zoghbi SS, Innis RB. The 5-HT1A Receptor PET Radioligand 11C-CUMI-101 Has Significant Binding to α1-Adrenoceptors in Human Cerebellum, Limiting Its Use as a Reference Region. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. déc 2016;57(12):1945-8.

142. Collier TL, Liang SH, Mann JJ, Vasdev N, Kumar JSD. Microfluidic radiosynthesis of [18F]FEMPT, a high affinity PET radiotracer for imaging serotonin receptors. Beilstein J Org Chem. 2017;13:2922-7.

143. Herth MM, Petersen IN, Hansen HD, Hansen M, Ettrup A, Jensen AA, et al. Synthesis and evaluation of 18F-labeled 5-HT2A receptor agonists as PET ligands. Nucl Med Biol. août 2016;43(8):455-62.

144. Petersen IN, Villadsen J, Hansen HD, Jensen AA, Lehel S, Gillings N, et al. Convergent 18 F-labeling and evaluation of N -benzyl-phenethylamines as 5-HT 2A receptor PET ligands. Bioorg Med Chem. nov 2016;24(21):5353-6.

145. Edgar FG, Hansen HD, Leth-Petersen S, Ettrup A, Kristensen JL, Knudsen GM, et al. Synthesis, radiofluorination, and preliminary evaluation of the potential 5-HT $_{2A}$ receptor agonists [^{18} F]Cimbi-92 and [^{18} F]Cimbi-150. J Label Compd Radiopharm. oct 2017;60(12):586-91.

146. Prabhakaran J, Underwood MD, Kumar JSD, Simpson NR, Kassir SA, Bakalian MJ, et al. Synthesis and in vitro evaluation of [18F]FECIMBI-36: A potential agonist PET ligand for 5-HT2A/2C receptors. Bioorg Med Chem Lett. sept 2015;25(18):3933-6.

147. Prabhakaran J, Solingapuram Sai KK, Zanderigo F, Rubin-Falcone H, Jorgensen MJ, Kaplan JR, et al. In vivo evaluation of [18 F]FECIMBI-36, an agonist 5-HT 2A/2C receptor PET radioligand in nonhuman primate. Bioorg Med Chem Lett. janv 2017;27(1):21-3.

148. Granda ML, Carlin SM, Moseley CK, Neelamegam R, Mandeville JB, Hooker JM. Synthesis and Evaluation of Methylated Arylazepine Compounds for PET Imaging of 5-HT $_{2c}$ Receptors. ACS Chem Neurosci. 20 févr 2013;4(2):261-5.

149. Kim J, Moon BS, Lee BC, Lee H-Y, Kim H-J, Choo H, et al. A Potential PET Radiotracer for the 5-HT $_{2C}$ Receptor: Synthesis and in Vivo Evaluation of 4-(3-[^{18} F]fluorophenethoxy)pyrimidine. ACS Chem Neurosci. 17 mai 2017;8(5):996-1003.

150. Kalgutkar AS, Bauman JN, McClure KF, Aubrecht J, Cortina SR, Paralkar J. Biochemical basis for differences in metabolism-dependent genotoxicity by two diazinylpiperazine-based 5-HT2C receptor agonists. Bioorg Med Chem Lett. mars 2009;19(6):1559-63.

151. Buiter HJ, Windhorst AD, Huisman MC, De Maeyer JH, Schuurkes JA, Lammertsma AA, et al. Radiosynthesis and preclinical evaluation of [11C]prucalopride as a potential agonist PET ligand for the 5-HT4 receptor. EJNMMI Res. 2013;3(1):24.

152. Lacivita E, Niso M, Hansen HD, Di Pilato P, Herth MM, Lehel S, et al. Design, synthesis, radiolabeling and in vivo evaluation of potential positron emission tomography (PET) radioligands for brain imaging of the 5-HT7 receptor. Bioorg Med Chem. mars 2014;22(5):1736-50.

153. Halldin C, Swahn CG, Neumeyer J, Hall H, Gao Y, Karlsson P. Preparation of two potent and selective dopamine D-2 receptor agonists: (R)-[proply-11C]-2-OH-NPA and (R)-[methyl-11C]-2-OCH3- NPA. J Label Compd Radiopharm. 1992;(35):265-6.

154. Farde L, Suhara T, Halldin C, Nybäck H, Nakashima Y, Swahn CG, et al. PET study of the M1-agonists [11C]xanomeline and [11C]butylthio-TZTP in monkey and man. Dement Basel Switz. août 1996;7(4):187-95.

155. Jesudason C, Barth VN, Goldsmith PJ, Ruley, Kevin, Johnson M, Mogg A, et al. Discovery of two novel, selective agonist radioligands as PET imaging agents for the M1 muscarinic acetylcholine receptor. J Nucl Med. 1 mai 2017;58:Supplement 1 546.

156. Mogg AJ, Eessalu T, Johnson M, Wright R, Sanger HE, Xiao H, et al. In Vitro Pharmacological Characterization and In Vivo Validation of LSN3172176 a Novel M1 Selective Muscarinic Receptor Agonist Tracer Molecule for Positron Emission Tomography. J Pharmacol Exp Ther. juin 2018;365(3):602-13.

157. Nabulsi NB, Holden D, Zheng M-Q, Bois F, Lin S-F, Najafzadeh S, et al. Evaluation of ^{11}C-LSN3172176 as a novel PET tracer for imaging M_1 muscarinic acetylcholine receptors in non-human primates. J Nucl Med. 7 févr 2019;jnumed.118.222034.

158. Yasuno F, Brown AK, Zoghbi SS, Krushinski JH, Chernet E, Tauscher J, et al. The PET Radioligand [11C]MePPEP Binds Reversibly and with High Specific Signal to Cannabinoid CB1 Receptors in Nonhuman Primate Brain. Neuropsychopharmacology. janv 2008;33(2):259-69.

159. Terry G, Liow J, Chernet E, Zoghbi S, Phebus L, Felder C, et al. Positron emission tomography imaging using an inverse agonist radioligand to assess cannabinoid CB1 receptors in rodents. NeuroImage. 2008;41:690–698.

160. Terry G, Liow J, Zoghbi S, Hirvonen J, Farris A, Lerner A, et al. Quantitation of cannabinoid CB1 receptors in healthy human brain using positron emission tomography and an inverse agonist radioligand. NeuroImage. 2009;48:362–370.

161. Terry GE, Hirvonen J, Liow J-S, Zoghbi SS, Gladding R, Tauscher JT, et al. Imaging and Quantitation of Cannabinoid CB1 Receptors in Human and Monkey Brains Using 18F-Labeled Inverse Agonist Radioligands. J Nucl Med. 1 janv 2010;51(1):112-20.

162. Hamill T, Sato N, Jitsuoka M, Tokita S, Sanabria S, Eng W, et al. Inverse agonist histamine H3 receptor PET tracers labelled with carbon-11 or fluorine-18. Synapse. 2009;63:1122–1132.

163. Donohue SR, Krushinski JH, Pike VW, Chernet E, Phebus L, Chesterfield AK, et al. Synthesis, Ex Vivo Evaluation, and Radiolabeling of Potent 1,5-Diphenylpyrrolidin-2-one Cannabinoid Subtype-1 Receptor Ligands as Candidates for In Vivo Imaging. J Med Chem. 25 sept 2008;51(18):5833-42.

164. Tsujikawa T, Zoghbi S, Hong J, Donohue S, Jenko K, Gladding R, et al. In vitro and in vivo evaluation of 11C-SD5024, a novel PET radioligand for human brain imaging of cannabinoid CB1 receptors. NeuroImage. 2014;84:733–741.

165. Schou M, Varnäs K, Jucaite A, Gulyás B, Halldin C, Farde L. Radiolabeling of the cannabinoid receptor agonist AZD1940 with carbon-11 and PET microdosing in non-human primate. Nucl Med Biol. avr 2013;40(3):410-4.

166. Marton J, Schoultz B, Hjørnevik T, Drzezga A, Yousefi B, Wester H, et al. Synthesis and Evaluation of a Full-Agonist Orvinol for PET-Imaging. CPEO J Med Chem. 2009;52:5586–5589.

167. Marton J, Henriksen G. Design and synthesis of an ^{18}F-labeled version of phenylethyl orvinol ([^{18}F]FE-PEO) for PET-imaging of opioid receptors. Mol Basel Switz. 28 sept 2012;17(10):11554-69.

168. Riss PJ, Hong YT, Marton J, Caprioli D, Williamson DJ, Ferrari V, et al. Synthesis and Evaluation of 18F-FE-PEO in Rodents: An 18F-Labeled Full Agonist for Opioid Receptor Imaging. J Nucl Med. 1 févr 2013;54(2):299-305.

169. Shiue C-Y, Bai L-Q, Teng R-R, Arnett CD, Dewey SL, Wolf AP, et al. A comparison of the brain uptake of N-(cyclopropyl[11C]methyl)norbuprenorphine ([11C]buprenorphine) and N-(cyclopropyl[11C]methyl)nordiprenorphme ([11C]diprenorphine) in baboon using PET. Int J Rad Appl Instrum B. janv 1991;18(3):281-8.

170. Galynker I, Schlyer DJ, Dewey SL, Fowler JS, Logan J, Galley SJ, et al. Opioid receptor imaging and displacement studies with [6-O-[11C]methyl]buprenorphine in baboon brain. Nucl Med Biol. avr 1996;23(3):325-31.

171. Guo M, Gao Z-G, Tyler R, Stodden T, Li Y, Ramsey J, et al. Preclinical Evaluation of the First Adenosine A1 Receptor Partial Agonist Radioligand for Positron Emission Tomography Imaging. J Med Chem. 21 nov 2018;61(22):9966-75.

172. Márián T, Lehel S, Lengyel Z, Balkay L, Horváth G, Mikecz P, et al. [The [18F]-FNECA serves as a suitable radioligand for PET investigation of purinergic receptor expression]. Orv Hetil. 26 mai 2002;143(21 Suppl 3):1319-22.

173. Lowe PT, Dall'Angelo S, Mulder-Krieger T, IJzerman AP, Zanda M, O'Hagan D. A New Class of Fluorinated A2A Adenosine Receptor Agonist with Application to Last-Step Enzymatic [18 F]Fluorination for PET Imaging. Chembiochem Eur J Chem Biol. 02 2017;18(21):2156-64.

174. Kato K, Zhang M-R, Suzuki K. Synthesis of (R,S)-[4-11C]baclofen via Michael addition of nitromethane labeled with short-lived 11C. Bioorg Med Chem Lett. nov 2009;19(21):6222-4.

175. Naik R, Valentine H, Dannals RF, Wong DF, Horti AG. Synthesis and Evaluation of a New 18F-Labeled Radiotracer for Studying the GABAB Receptor in the Mouse Brain. ACS Chem Neurosci. 20 2018;9(6):1453-61.

176. Burnet P. [3H]WAY–100635 for 5–HT1A receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8–OH–DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. Neurochem Int. 7 juin 1997;30(6):565-74.

177. Ito H, Halldin C, Farde L. Localization of 5-HT1A receptors in the living human brain using [carbonyl-11C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. janv 1999;40(1):102-9.

178. Passchier J, van Waarde A. Visualisation of serotonin-1A (5-HT1A) receptors in the central nervous system. Eur J Nucl Med. janv 2001;28(1):113-29.

179. Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM. Rethinking 5-HT $_{1A}$ Receptors: Emerging Modes of Inhibitory Feedback of Relevance to Emotion-Related Behavior. ACS Chem Neurosci. 16 janv 2013;4(1):72-83.

180. Emerit MB, El Mestikawy S, Gozlan H, Rouot B, Hamon M. Physical evidence of the coupling of solubilized 5-HT1A binding sites with G regulatory proteins. Biochem Pharmacol. janv 1990;39(1):7-18.

181. Kobilka B. Adrenergic Receptors as Models for G Protein-Coupled Receptors. Annu Rev Neurosci. mars 1992;15(1):87-114.

182. Lacivita E, Di Pilato P, De Giorgio P, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R, et al. The therapeutic potential of 5-HT1A receptors: a patent review. Expert Opin Ther Pat. août 2012;22(8):887-902.

183. Cowen PJ. Psychopharmacology of 5-HT1A receptors. Nucl Med Biol. juill 2000;27(5):437-9.

184. Zimmer L, Mauger G, Le Bars D, Bonmarchand G, Luxen A, Pujol J-F. Effect of endogenous serotonin on the binding of the 5-hT1A PET ligand 18F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic beta measurements combined with microdialysis. J Neurochem. janv 2002;80(2):278-86.

185. Borg J. Molecular imaging of the 5-HT1A receptor in relation to human cognition. Behav Brain Res. déc 2008;195(1):103-11.

186. Kepe V, Huang S, Small GW, Satyamurthy N, Barrio JR. Visualizing Pathology Deposits in the Living Brain of Patients with Alzheimer's Disease. In: Methods in Enzymology [Internet]. Elsevier; 2006 [cité 13 avr 2020]. p. 144-60. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687906120108

187. Lanctôt KL, Herrmann N, Ganjavi H, Black SE, Rusjan PM, Houle S, et al. Serotonin-1A receptors in frontotemporal dementia compared with controls. Psychiatry Res Neuroimaging. déc 2007;156(3):247-50.

188. Truchot L, Costes N, Zimmer L, Laurent B, Le Bars D, Thomas-Antérion C, et al. A distinct [18F]MPPF PET profile in amnestic mild cognitive impairment compared to mild Alzheimer's disease. NeuroImage. avr 2008;40(3):1251-6.

189. Verdurand M, Bérod A, Le Bars D, Zimmer L. Effects of amyloid-β peptides on the serotoninergic 5-HT1A receptors in the rat hippocampus. Neurobiol Aging. janv 2011;32(1):103-14.

190. Polter AM, Li X. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. Cell Signal. oct 2010;22(10):1406-12.

191. Thathiah A, De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. févr 2011;12(2):73-87.

192. Zimmer L, Le Bars D. Current status of positron emission tomography radiotracers for serotonin receptors in humans: Current status of PET radiotracers for serotonin receptors in humans. J Label Compd Radiopharm. mars 2013;56(3-4):105-13.

193. Aznavour N, Zimmer L. [18F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT1A receptors in animal and human brain. Neuropharmacology. mars 2007;52(3):695-707.

194. Maurel JL, Autin J-M, Funes P, Newman-Tancredi A, Colpaert F, Vacher B. High-Efficacy 5-HT $_{1A}$ Agonists for Antidepressant Treatment: A Renewed Opportunity. J Med Chem. oct 2007;50(20):5024-33.

195. Lemoine L, Becker G, Vacher B, Billard T, Lancelot S, Newman-Tancredi A, et al. Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of 18F-F13714 as a Fluorinated 5-HT1A Receptor Agonist Radioligand for PET Neuroimaging. J Nucl Med. 1 juin 2012;53(6):969-76.

196. Becker G, Streichenberger N, Billard T, Newman-Tancredi A, Zimmer L. A postmortem study to compare agonist and antagonist 5-HT1A receptor-binding sites in Alzheimer's disease. CNS Neurosci Ther. oct 2014;20(10):930-4.

197. Vacher B, Bonnaud B, Funes P, Jubault N, Koek W, Assié M-B, et al. Novel Derivatives of 2-Pyridinemethylamine as Selective, Potent, and Orally Active Agonists at 5-HT $_{1A}$ Receptors. J Med Chem. mai 1999;42(9):1648-60.

198. Heusler P, Palmier C, Tardif S, Bernois S, Colpaert FC, Cussac D. [3H]-F13640, a novel, selective and high-efficacy serotonin 5-HT1A receptor agonist radioligand. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. oct 2010;382(4):321-30.

199. Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, Xu X-J, et al. Large-amplitude 5-HT1A receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. Neuropharmacology. nov 2002;43(6):945-58.

200. Wurch T, Colpaert FC, Pauwels PJ. Mutation in a protein kinase C phosphorylation site of the 5-HT1A receptor preferentially attenuates Ca2+ responses to partial as opposed to higher-efficacy 5-HT1A agonists. Neuropharmacology. juin 2003;44(7):873-81.

201. Colpaert FC. System theory of pain and of opiate analgesia: no tolerance to opiates. Pharmacol Rev. sept 1996;48(3):355-402.

202. Buritova J, Tarayre J-P, Besson J-M, Colpaert F. The novel analgesic and high-efficacy 5-HT1A receptor agonist, F 13640 induces c-Fos protein expression in spinal cord dorsal horn neurons. Brain Res. juin 2003;974(1-2):212-21.

203. Deseure K, Koek W, Adriaensen H, Colpaert FC. Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine1A agonist (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl) -amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone (F 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. J Pharmacol Exp Ther. 2003;306:505-14.

204. Bardin L, Tarayre JP, Malfetes N, Koek W, Colpaert FC. Profound, Non-Opioid Analgesia Produced by the High-Efficacy 5-HT$_{1A}$ Agonist F 13640 in the Formalin Model of Tonic Nociceptive Pain. Pharmacology. 2003;67(4):182-94.

205. Valensi P. A Dose-Finding Study of Efficacy and Safety of F13640 (Befiradol) in Patients with Moderate to Severe Painful Peripheral Diabetic Polyneuropathy. BEST-Diabetes Study (Befiradol Dose-Finding Study in diabetic patients). 2011 nov. Report No.: 2009-012123-28.

206. Sałat K, Kołaczkowski M, Furgała A, Rojek A, Śniecikowska J, Varney MA, et al. Antinociceptive, antiallodynic and antihyperalgesic effects of the 5-HT 1A receptor selective agonist, NLX-112 in mouse models of pain. Neuropharmacology. oct 2017;125:181-8.

207. Iderberg H, McCreary AC, Varney MA, Kleven MS, Koek W, Bardin L, et al. NLX-112, a novel 5-HT 1A receptor agonist for the treatment of l -DOPA-induced dyskinesia: Behavioral and neurochemical profile in rat. Exp Neurol. sept 2015;271:335-50.

208. McCreary AC, Varney MA, Newman-Tancredi A. The novel 5-HT 1A receptor agonist, NLX-112 reduces l -DOPA-induced abnormal involuntary movements in rat: A chronic administration study with microdialysis measurements. Neuropharmacology. juin 2016;105:651-60.

209. Newman-Tancredi A, Bardin L, Auclair A, Colpaert F, Depoortère R, Varney MA. NLX-112, a highly selective 5-HT1A receptor agonist, mediates analgesia and antidepressant-like activity in rats via spinal cord and prefrontal cortex 5-HT1A receptors, respectively. Brain Res. 01 2018;1688:1-7.

210. Fisher R, Hikima A, Morris R, Jackson MJ, Rose S, Varney MA, et al. The selective 5-HT1A receptor agonist, NLX-112, exerts anti-dyskinetic and anti-parkinsonian-like effects in MPTP-treated marmosets. Neuropharmacology. mai 2020;167:107997.

211. Vidal B, Fieux S, Colom M, Billard T, Bouillot C, Barret O, et al. 18F-F13640 preclinical evaluation in rodent, cat and primate as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging. Brain Struct Funct. juill 2018;223(6):2973-88.

212. Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. Front Behav Neurosci [Internet]. 6 juin 2014 [cité 15 avr 2020];8. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00199/abstract

213. Depoortère R, Auclair AL, Bardin L, Colpaert FC, Vacher B, Newman-Tancredi A. F15599, a preferential post-synaptic 5-HT1A receptor agonist: Activity in models of cognition in comparison with reference 5-HT1A receptor agonists. Eur Neuropsychopharmacol. sept 2010;20(9):641-54.

214. Truchot L, Costes SN, Zimmer L, Laurent B, Le Bars D, Thomas-Anterion C, et al. Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment. Neurology. 4 sept 2007;69(10):1012-7.

215. Verdurand M, Zimmer L. Hippocampal 5-HT 1A receptor expression changes in prodromal stages of Alzheimer's disease: Beneficial or deleterious? Neuropharmacology. sept 2017;123:446-54.

216. Vidal B, Sebti J, Verdurand M, Fieux S, Billard T, Streichenberger N, et al. Agonist and antagonist bind differently to 5-HT1A receptors during Alzheimer's disease: A post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. Neuropharmacology. 2016;109:88-95.

217. Tyacke RJ, Nutt DJ. Optimising PET approaches to measuring 5-HT release in human brain. Synap N Y N. oct 2015;69(10):505-11.

218. Rudnick G, Clark J. From synapse to vesicle: The reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. oct 1993;1144(3):249-63.

219. Garattini S, Mennini T, Bendotti C, Invernizzi R, Samanin R. Neurochemical mechanism of action of drugs which modify feeding via the serotoninergic system. Appetite. janv 1986;7:15-38.

220. Kapur S, Meyer J, Wilson AA, Houle S, Brown GM. Modulation of cortical neuronal activity by a serotonergic agent: a PET study in humans. Brain Res. mai 1994;646(2):292-4.

221. Meyer JH, Kapur S, Wilson AA, DaSilva JN, Houle S, Brown GM. Neuromodulation of frontal and temporal cortex by intravenous d-fenfluramine: an [15O]H2O PET study in humans. Neurosci Lett. 22 mars 1996;207(1):25-8.

222. Carson RE. PET physiological measurements using constant infusion. Nucl Med Biol. oct 2000;27(7):657-60.

223. Hume S, Hirani E, Opacka-Juffry J, Myers R, Townsend C, Pike V, et al. Effect of 5-HT on binding of [11C] WAY 100635 to 5-HT1A receptors in rat brain, assessed using in vivo microdialysis and PET after fenfluramine. Synapse. août 2001;41(2):150-9.

224. Jorgensen LM, Weikop P, Villadsen J, Visnapuu T, Ettrup A, Hansen HD, et al. Cerebral 5-HT release correlates with [^{11} C]Cimbi36 PET measures of 5-HT2A receptor occupancy in the pig brain. J Cereb Blood Flow Metab. févr 2017;37(2):425-34.

225. Udo de Haes JI, Cremers TIFH, Bosker F-J, Postema F, Tiemersma-Wegman TD, den Boer JA. Effect of increased serotonin levels on [18F]MPPF binding in rat brain: fenfluramine vs the combination of citalopram and ketanserin. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol. sept 2005;30(9):1624-31.

226. Colom M. Modélisation Pharmacocinétique du [18F]F13640. Lyon (France): université de Lyon; 2016 mai p. 26.

227. Zhang Y, Fox GB. PET imaging for receptor occupancy: meditations on calculation and simplification. J Biomed Res. mars 2012;26(2):69-76.

228. Costes N. Neurotransmission sérotoninergique 5-HT1A : approche méthodologique de la mesure in vivo par le [18F] MPPF en tomographie par émission de positons [Thèse de doctorat en neurologie]. Université Claude Bernard Lyon 1; 2007.

229. Takeuchi Y, Kimura H, Sano Y. Immunohistochemical demonstration of the distribution of serotonin neurons in the brainstem of the rat and cat. Cell Tissue Res. 1982;224(2):247-67.

230. Kerr CWH, Bishop GA. Topographical organization in the origin of serotoninergic projections to different regions of the cat cerebellar cortex. J Comp Neurol. 15 févr 1991;304(3):502-15.

231. Costes N, Merlet I, Ostrowsky K, Faillenot I, Lavenne F, Zimmer L, et al. A 18F-MPPF PET normative database of 5-HT1A receptor binding in men and women over aging. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. déc 2005;46(12):1980-9.

232. Kitzman PH, Bishop GA. The origin of serotoninergic afferents to the cat's cerebellar nuclei. J Comp Neurol. 22 févr 1994;340(4):541-50.

233. Leger L, Charnay Y, Hof PR, Bouras C, Cespuglio R. Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat. J Comp Neurol. 30 avr 2001;433(2):157-82.

234. Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, et al. Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system. J Comp Neurol. 5 févr 1996;365(2):289-305.

235. Udo de Haes JI, Harada N, Elsinga PH, Maguire RP, Tsukada H. Effect of fenfluramine-induced increases in serotonin release on [18F]MPPF binding: a continuous infusion PET study in conscious monkeys. Synap N Y N. janv 2006;59(1):18-26.

236. Moulin-Sallanon M, Charnay Y, Ginovart N, Perret P, Lanfumey L, Hamon M, et al. Acute and chronic effects of citalopram on 5-HT1A receptor-Labeling by [18F]MPPF and-Coupling to receptors-G proteins. Synapse. 18 nov 2008;63(2):106-16.

237. Maeda J, Suhara T, Ogawa M, Okauchi T, Kawabe K, Zhang MR, et al. In vivo binding properties of [carbonyl-11C]WAY-100635: effect of endogenous serotonin. Synap N Y N. mai 2001;40(2):122-9.

238. Rabiner EA, Messa C, Sargent PA, Husted-Kjaer K, Montgomery A, Lawrence AD, et al. A Database of [11C]WAY-100635 Binding to 5-HT1A Receptors in Normal Male Volunteers: Normative Data and Relationship to Methodological, Demographic, Physiological, and Behavioral Variables. NeuroImage. mars 2002;15(3):620-32.

239. Aznavour N, Rbah L, Riad M, Reilhac A, Costes N, Descarries L, et al. A PET imaging study of 5-HT1A receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. NeuroImage. nov 2006;33(3):834-42.

240. Sibon I, Benkelfat C, Gravel P, Aznavour N, Costes N, Mzengeza S, et al. Decreased [18F]MPPF Binding Potential in the Dorsal Raphe Nucleus After a Single Oral Dose of Fluoxetine: A Positron-Emission Tomography Study in Healthy Volunteers. Biol Psychiatry. juin 2008;63(12):1135-40.

241. De Haes JIU, Bosker FJ, Van Waarde A, Pruim J, Willemsen ATM, Vaalburg W, et al. 5-HT1A receptor imaging in the human brain: Effect of tryptophan depletion and infusion on [18F]MPPF binding. Synapse. nov 2002;46(2):108-15.

242. Giovacchini G, Lang L, Ma Y, Herscovitch P, Eckelman WC, Carson RE. Differential effects of paroxetine on raphe and cortical 5-HT1A binding: A PET study in monkeys. NeuroImage. oct 2005;28(1):238-48.

243. Selvaraj S, Turkheimer F, Rosso L, Faulkner P, Mouchlianitis E, Roiser JP, et al. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission in humans: a [11C]CUMI-101 PET challenge study. Mol Psychiatry. déc 2012;17(12):1254-60.

244. Nichols DE, Nichols C. D. Serotonin receptors. 2008;108:1614-41.

245. Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, et al. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. J Comp Neurol. 7 févr 2000;417(2):181-94.

246. Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Vergé D, Hamon M. Effect of the selective lesion of serotoninergic neurons on the regional distribution of 5-HT1A receptor mRNA in the rat brain. Brain Res Mol Brain Res. août 1992;14(4):357-62.

247. Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S, Hamon M. Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT1A subtype. Eur J Pharmacol. 31 juill 1985;113(3):463-4.

248. Radja F, Laporte AM, Daval G, Vergé D, Gozlan H, Hamon M. Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. Neurochem Int. 1991;18(1):1-15.

249. Buhot MC. Serotonin receptors in cognitive behaviors. Curr Opin Neurobiol. avr 1997;7(2):243-54.

250. Kristian Eide P, Mjellem Joly N, Hole K. The role of spinal cord 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the modulation of a spinal nociceptive reflex. Brain Res. déc 1990;536(1-2):195-200.

251. Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. Biol Psychiatry. oct 2009;66(7):627-35.

252. Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, et al. 5-HT1A Autoreceptor Levels Determine Vulnerability to Stress and Response to Antidepressants. Neuron. janv 2010;65(1):40-52.

253. Maćkowiak M, Czyrak A, Wedzony K. [The involvement of 5-HT1a serotonin receptors in the pathophysiology and pharmacotherapy of schizophrenia]. Psychiatr Pol. août 2000;34(4):607-21.

254. Shimizu S, Ohno Y. Improving the Treatment of Parkinson's Disease: A Novel Approach by Modulating 5-HT(1A) Receptors. Aging Dis. févr 2013;4(1):1-13.

255. Paterson LM, Tyacke RJ, Nutt DJ, Knudsen GM. Measuring Endogenous 5-HT Release by Emission Tomography: Promises and Pitfalls. J Cereb Blood Flow Metab. oct 2010;30(10):1682-706.

256. da Cunha-Bang S, Ettrup A, Mc Mahon B, Skibsted AP, Schain M, Lehel S, et al. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission with [11C]Cimbi-36 positron emission tomography in humans. Transl Psychiatry. déc 2019;9(1):134.

257. Yang K-C, Takano A, Halldin C, Farde L, Finnema SJ. Serotonin concentration enhancers at clinically relevant doses reduce [11C]AZ10419369 binding to the 5-HT1B receptors in the nonhuman primate brain. Transl Psychiatry. déc 2018;8(1):132.

258. Zimmer L, Mauger G, Le Bars D, Bonmarchand G, Luxen A, Pujol J-F. Effect of endogenous serotonin on the binding of the 5-hT1A PET ligand 18F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic beta measurements combined with microdialysis. J Neurochem. janv 2002;80(2):278-86.

259. Zimmer L, Rbah L, Giacomelli F, Le Bars D, Renaud B. A reduced extracellular serotonin level increases the 5-HT1A PET ligand 18F-MPPF binding in the rat hippocampus. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. sept 2003;44(9):1495-501.

260. Jørgensen LM, Weikop P, Villadsen J, Visnapuu T, Ettrup A, Hansen HD, et al. Cerebral 5-HT release correlates with [11C]Cimbi36 PET measures of 5-HT2A receptor occupancy in the pig brain. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. févr 2017;37(2):425-34.

261. Vidal B, Fieux S, Colom M, Billard T, Bouillot C, Barret O, et al. 18F-F13640 preclinical evaluation in rodent, cat and primate as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging. Brain Struct Funct. juill 2018;223(6):2973-88.

262. Vidal B, Fieux S, Redouté J, Villien M, Bonnefoi F, Le Bars D, et al. In vivo biased agonism at 5-HT1A receptors: characterisation by simultaneous PET/MR imaging. Neuropsychopharmacology. oct 2018;43(11):2310-9.

263. Normandin MD, Schiffer WK, Morris ED. A linear model for estimation of neurotransmitter response profiles from dynamic PET data. NeuroImage. févr 2012;59(3):2689-99.

264. Lancelot S, Costes N, Lemoine L, Zimmer L. Development and evaluation of a digital atlas for PET neuroimaging in domestic cat (Felis catus). Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010;37:S387-7.

265. Merida I, Olivier F, Hammers A, Redouté J, Reilhac A, Costes N, et al. Kinetic modelling for endogenous neurotransmitter discharge characterization using PET imaging: optimization of lp-ntPET. Abstract présenté à: Neuro Receptor Mapping; 2018; Londres.

266. Kyme AZ, Angelis GI, Eisenhuth J, Fulton RR, Zhou V, Hart G, et al. Open-field PET: Simultaneous brain functional imaging and behavioural response measurements in freely moving small animals. NeuroImage. mars 2019;188:92-101.

267. Sander CY, Hooker JM, Catana C, Normandin MD, Alpert NM, Knudsen GM, et al. Neurovascular coupling to D2/D3 dopamine receptor occupancy using simultaneous PET/functional MRI. Proc Natl Acad Sci. 2 juill 2013;110(27):11169-74.

268. Erritzoe D, Ashok AH, Searle GE, Colasanti A, Turton S, Lewis Y, et al. Serotonin release measured in the human brain: a PET study with [11C]CIMBI-36 and d-amphetamine challenge. Neuropsychopharmacology. avr 2020;45(5):804-10.

269. Colom M, Costes N, Redouté J, Dailler F, Gobert F, Le Bars D, et al. 18F-F13640 PET imaging of functional receptors in humans. Eur J Nucl Med Mol Imaging. janv 2020;47(1):220-1.

270. Portas CM, McCarley RW. Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus: a microdialysis study in the freely moving cat. Brain Res. juin 1994;648(2):306-12.

271. Assié MB, Koek W. Possible in vivo 5-HT reuptake blocking properties of 8-OH-DPAT assessed by measuring hippocampal extracellular 5-HT using microdialysis in rats. Br J Pharmacol. nov 1996;119(5):845-50.

272. Balcioglu A, Wurtman RJ. Effects of fenfluramine and phentermine (fen-phen) on dopamine and serotonin release in rat striatum: in vivo microdialysis study in conscious animals. Brain Res. 30 nov 1998;813(1):67-72.

273. Gardier AM, Trillat A-C, Malagié I, Jacquot C. 8-OH-DPAT attenuates the dexfenfluramine-induced increase in extracellular serotonin: an in vivo dialysis study. Eur J Pharmacol. nov 1994;265(1-2):107-10.

274. Hume S, Hirani E, Opacka-Juffry J, Myers R, Townsend C, Pike V, et al. Effect of 5-HT on binding of [(11)C] WAY 100635 to 5-HT(IA) receptors in rat brain, assessed using in vivo microdialysis nd PET after fenfluramine. Synap N Y N. août 2001;41(2):150-9.

275. Nénonéné EK, Radja F, Carli M, Grondin L, Reader TA. Heterogeneity of cortical and hippocampal 5-HT1A receptors: a reappraisal of homogenate binding with 8-[3H]hydroxydipropylaminotetralin. J Neurochem. mai 1994;62(5):1822-34.

276. Bantick RA, Rabiner EA, Hirani E, de Vries MH, Hume SP, Grasby PM. Occupancy of Agonist Drugs at the 5-HT1A Receptor. Neuropsychopharmacology. mai 2004;29(5):847-59.

277. Udo de Haes JI, Harada N, Elsinga PH, Maguire RP, Tsukada H. Effect of fenfluramine-induced increases in serotonin release on [18F]MPPF binding: a continuous infusion PET study in conscious monkeys. Synap N Y N. janv 2006;59(1):18-26.

278. Jagoda EM, Lang L, Tokugawa J, Simmons A, Ma Y, Contoreggi C, et al. Development of 5-HT1A receptor radioligands to determine receptor density and changes in endogenous 5-HT. Synap N Y N. mai 2006;59(6):330-41.

279. Ginovart N. Imaging the dopamine system with in vivo [11C]raclopride displacement studies: understanding the true mechanism. Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging. févr 2005;7(1):45-52.

280. Zimmer L, Riad M, Rbah L, Belkacem-Kahlouli A, Le Bars D, Renaud B, et al. Toward brain imaging of serotonin 5-HT1A autoreceptor internalization. NeuroImage. juill 2004;22(3):1421-6.

281. Shiue CY, Shiue GG, Mozley PD, Kung MP, Zhuang ZP, Kim HJ, et al. P-[18F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT1A receptors in humans. Synap N Y N. févr 1997;25(2):147-54.

282. Mathis CA, Simpson NR, Mahmood K, Kinahan PE, Mintun MA. [11C]WAY 100635: A radioligand for imaging 5-HT1A receptors with positron emission tomography. Life Sci. janv 1994;55(20):PL403-7.

283. Charnay Y, Léger L, Vallet P, Greggio B, Hof PR, Jouvet M, et al. Autoradiographic distribution of [3H]paroxetine binding sites in the cat brain. Vol. 13. 1997. 39 p.

284. Yokoyama C, Mawatari A, Kawasaki A, Takeda C, Onoe K, Doi H, et al. Marmoset Serotonin 5-HT $_{1A}$ Receptor Mapping with a Biased Agonist PET Probe ^{18} F-F13714: Comparison with an Antagonist Tracer ^{18} F-MPPF in Awake and Anesthetized States. Int J Neuropsychopharmacol. déc 2016;19(12):pyw079.

285. Jack CR, Bernstein MA, Fox NC, Thompson P, Alexander G, Harvey D, et al. The Alzheimer's disease neuroimaging initiative (ADNI): MRI methods. J Magn Reson Imaging. avr 2008;27(4):685-91.

286. Hammers A, Allom R, Koepp MJ, Free SL, Myers R, Lemieux L, et al. Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. Hum Brain Mapp. août 2003;19(4):224-47.

287. Hines CS, Liow J-S, Zanotti-Fregonara P, Hirvonen J, Morse C, Pike VW, et al. Human Biodistribution and Dosimetry of 11C-CUMI-101, an Agonist Radioligand for Serotonin-1A Receptors in Brain. Gelovani JG, éditeur. PLoS ONE. 27 sept 2011;6(9):e25309.

288. Galligan JJ. Differential inhibition of cholinergic and noncholinergic neurogenic contractions by 5-hydroxytryptamine1A receptor agonists in guinea pig ileum. J Pharmacol Exp Ther. janv 1992;260(1):306-12.

289. Spreux-Varoquaux. Sérotonine: Aspects biologiques et cliniques. Médecine Sciences Publications. Lavoisier; 517 p.

290. Sanabria-Bohórquez SM, Hamill TG, Goffin K, De Lepeleire I, Bormans G, Burns HD, et al. Kinetic analysis of the cannabinoid-1 receptor PET tracer [18F]MK-9470 in human brain. Eur J Nucl Med Mol Imaging. mai 2010;37(5):920-33.

291. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). Cephalalgia. juill 2013;33(9):629-808.

292. May A, Schwedt TJ, Magis D, Pozo-Rosich P, Evers S, Wang S-J. Cluster headache. Nat Rev Dis Primer. juin 2018;4(1):18006.

293. Hoffmann J, May A. Diagnosis, pathophysiology, and management of cluster headache. Lancet Neurol. janv 2018;17(1):75-83.

294. Yang F-C, Chou K-H, Kuo C-Y, Lin Y-Y, Lin C-P, Wang S-J. The pathophysiology of episodic cluster headache: Insights from recent neuroimaging research. Cephalalgia. avr 2018;38(5):970-83.

295. Sokolov AY, Lyubashina OA, Panteleev SS. The role of serotonin receptors in migraine headaches. Neurochem J. juin 2011;5(2):92-9.

296. Waldenlind E, Ross SB, Sääf J, Ekbom K, Wetterberg L. Concentration and Uptake of 5-Hydroxytryptamine in Platelets from Cluster Headache and Migraine Patients. Cephalalgia. mars 1985;5(1):45-54.

297. Nesbitt AD, Goadsby PJ. Cluster headache. BMJ. 11 avr 2012;344(apr11 1):e2407-e2407.

298. Robbins MS, Starling AJ, Pringsheim TM, Becker WJ, Schwedt TJ. Treatment of Cluster Headache: The American Headache Society Evidence-Based Guidelines: Headache. Headache J Head Face Pain. juill 2016;56(7):1093-106.

299. Law S, Derry S, Moore RA. Triptans for acute cluster headache. Cochrane Pain, Palliative and Supportive Care Group, éditeur. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 17 juill 2013 [cité 20 avr 2020]; Disponible sur: http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD008042.pub3

300. Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, et al. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A−/−, 5-HT1B−/−, 5-HT2A−/−, 5-HT3A−/− and 5-HTT−/− knock-out male mice: Pain. août 2007;130(3):235-48.

301. Louter MA, Wilbrink LA, Haan J, van Zwet EW, van Oosterhout WPJ, Zitman FG, et al. Cluster headache and depression. Neurology. 1 nov 2016;87(18):1899-906.

302. Bannister K, Bee LA, Dickenson AH. Preclinical and early clinical investigations related to monoaminergic pain modulation. Neurotherapeutics. oct 2009;6(4):703-12.

303. You I-J, Wright SR, Garcia-Garcia AL, Tapper AR, Gardner PD, Koob GF, et al. 5-HT1A Autoreceptors in the Dorsal Raphe Nucleus Convey Vulnerability to Compulsive Cocaine Seeking. Neuropsychopharmacology. avr 2016;41(5):1210-22.

304. Müller CP, Carey RJ, Huston JP, De Souza Silva MA. Serotonin and psychostimulant addiction: Focus on 5-HT1A-receptors. Prog Neurobiol. févr 2007;81(3):133-78.

305. Govare A, Leroux E. Licit and Illicit Drug Use in Cluster Headache. Curr Pain Headache Rep. mai 2014;18(5):413.

306. Iacovelli E, Coppola G, Tinelli E, Pierelli F, Bianco F. Neuroimaging in cluster headache and other trigeminal autonomic cephalalgias. J Headache Pain. janv 2012;13(1):11-20.

307. Goadsby PJ. Pathophysiology of cluster headache: a trigeminal autonomic cephalgia. Lancet Neurol. août 2002;1(4):251-7.

308. May A, Leone M. Update on cluster headache: Curr Opin Neurol. juin 2003;16(3):333-40.

ANNEXE : TITRES ET TRAVAUX

Poster

- **Colom M,** Vidal B, Redouté J, Costes N, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Radiopharmacological exploration of [^{18}F]F13640, a 5-HT$_{1A}$ radiotracer sensitive to brain serotonin fluctuations [Internet]. Poster présenté au congrès SFPT; 2019 juin 12; Lyon (France).

Articles

- **Colom M**, Vidal B, Fieux S , Redoute J, Costes N, Lavenne F, Mérida I, Irace Z, Iecker T, Bouillot C, Billard T, Newman-Tancredi A, Zimmer L. [^{18}F]F13640, a 5-HT$_{1A}$ receptor radiopharmaceutical sensitive to brain serotonin fluctuations. *En soumission.*

- **Colom M**, Costes N, Redouté J, Dailler F, Gobert F, Le Bars D, et al. [^{18}F]F13640 PET imaging of functional receptors in humans. Eur J Nucl Med Mol Imaging. janv 2020;47(1):220-1.

- **Colom M,** Vidal B, Zimmer L. Is There a Role for GPCR Agonist Radiotracers in PET Neuroimaging? Front Mol Neurosci. 2019;12:255.

- Vidal B, Fieux S, **Colom M**, Billard T, Bouillot C, Barret O, et al. [^{18}F]F13640 preclinical evaluation in rodent, cat and primate as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging. Brain Struct Funct. juill 2018;223(6):2973-88.

Appels d'offres sollicités avec succès pendant le doctorat

Thellie : 17 000 euros

Fondation APICIL : 20 000 euros

Fondation Neurodis : 20 000 euros

Illustration Emilie Josso : https://emiliejo.net/