

**ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies**  
**INSERM U930 « Imagerie et Cerveau », Equipe 3**

## **THÈSE** présentée par : **Nicolas ARLICOT**

soutenue le : **08 décembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : «Sciences de la Vie et de la Santé»

**Imagerie moléculaire de la neuroinflammation**  
**Evaluation préclinique d'un nouveau**  
**radiopharmaceutique : Le CLINDE**

### **THÈSE dirigée par :**

**Monsieur GUILLOTEAU Denis** Professeur, Université François – Rabelais

### **RAPPORTEURS :**

**Madame GHEZZI Catherine** Maître de Conférence Universitaire – Université Grenoble 1

**Monsieur ZIMMER Luc** Professeur, Praticien Hospitalier – Université Lyon 1 Site santé Rockefeller

### **JURY :**

**Monsieur FAIVRE-CHAUVET Alain** Professeur, Praticien Hospitalier – Université Nantes - CHRU de Nantes

**Monsieur ANTIER Daniel** Maître de Conférence Universitaire, Praticien Hospitalier Université François Rabelais, Tours – CHRU de Tours

**Madame CHALON Sylvie** Docteur es Sciences - Directeur de Recherche - UMR INSERM U930 – ERL 3106, Tours

**Monsieur GUILLOTEAU Denis** Professeur, Praticien Hospitalier – Université François Rabelais, Tours - CHRU de Tours

## Remerciements

*Merci...*

*A Denis Guilloteau et à Sylvie Chalon pour m'avoir encadré et guidé durant toutes ces années, pour leurs compétences, leur patience et leur gentillesse.*

*Aux membres du jury, qui ont accepté d'examiner et juger mon travail.*

*A tous mes collègues de travail que j'ai un jour croisés au sein de l'équipe 3 de l'U930, ou à l'hôpital.*

*A mes proches, famille, je vous adresse à tous mes pensées les plus reconnaissantes.*

*Merci à tous pour votre aide, votre soutien et votre amitié.*

## Résumé

La protéine translocatrice 18kDa (TSPO), en reflétant l'activation microgliale et la neuroinflammation, est actuellement reconnue comme un marqueur sensible de la survenue d'événements pathologiques dans le cerveau. Par conséquent, la TSPO est une cible privilégiée pour l'étude des pathologies du cerveau par imagerie moléculaire (TEP/TEMP). Il y a actuellement un manque d'outils efficaces pour explorer la neuroinflammation en TEMP. Notre objectif a donc été d'évaluer un nouveau radiopharmaceutique de forte affinité pour la TSPO, utilisable en TEMP : le CLINDE, dans deux modèles animaux : l'excitotoxicité focale et l'ischémie cérébrale. Dans ces deux modèles, les études *ex vivo* ont mis en évidence une accumulation préférentielle du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans les régions cérébrales lésées, riches en cellules microgliales. De plus, nous avons observé une relation quantitative entre l'intensité de la lésion cérébrale et la fixation du radiopharmaceutique. Le CLINDE apparaît donc comme un candidat très prometteur pour l'imagerie TEMP de la neuroinflammation en recherche clinique.

## Résumé en anglais

The 18kDa Translocator protein (TSPO) is currently the most reliable marker for pathological events in the brain, reflecting microglial activation and neuroinflammation, which are linked to neuronal damage. Thereby, TSPO is a potential target to evaluate neuroinflammatory changes in a variety of brain diseases by molecular imaging (PET/SPECT). To date, there is a lack of effective tool to explore neuroinflammation by SPECT. Our aim was to evaluate a new high-affinity ligand for TSPO SPECT imaging: the CLINDE, in two rodent models: focal excitotoxicity and cerebral ischemia. In both animal models, *ex vivo* studies highlighted preferential localisation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE accumulation in cerebral area that also expressed activated microglial cells as assessed by immunohistochemical staining. Moreover, we found a quantitative relationship between the intensity of brain damages and radiotracer binding, making CLINDE an attractive radioionidated candidate for imaging neuroinflammation by SPECT in clinical applications.

# Table des Matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>2</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé en anglais</b> .....	<b>4</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>13</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>14</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>Première partie : Imagerie Moléculaire et Médicament Radiopharmaceutique</b> .....	<b>21</b>
I. Principes de l'Imagerie moléculaire .....	22
A. Notions de physique nucléaire - radioactivité .....	22
B. Imagerie moléculaire : application à la médecine nucléaire .....	32
II. Le Médicament Radiopharmaceutique .....	39
A. Définition et dispositions légales .....	39
B. Caractéristiques du médicament radiopharmaceutique .....	41
<b>Deuxième partie : Imagerie Moléculaire de la Neuroinflammation</b> .....	<b>48</b>
I. Pathologies neurologiques et variabilité de la mort neuronale .....	49
II. Physiopathologie de la neuroinflammation .....	49
III. Cibles potentielles pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation .....	50
A. Cyclooxygénase et imagerie moléculaire de la neuroinflammation .....	51

B. La forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) comme cible potentielle pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation .....	55
IV. La protéine translocatrice (TSPO) comme cible potentielle pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation .....	57
A. La microglie.....	57
B. La protéine translocatrice .....	60
C. Imagerie moléculaire de la TSPO avec le PK11195 : de l'autoradiographie <i>in vitro</i> à l'imagerie TEP <i>in vivo</i> .....	69
D. Nouveaux radioligands pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation utilisant la TSPO comme cible moléculaire. ....	82
<b>Troisième partie : Evaluation préclinique du CLINDE .....</b>	<b>103</b>
I. Travail expérimental : contexte et objectifs .....	104
A. Le CLINDE .....	104
B. Choix des modèles animaux .....	106
C. Objectifs du travail de thèse .....	111
II. Chimie et radiochimie du CLINDE .....	111
A. Matériels et méthodes .....	111
B. Résultats .....	113
C. Discussion.....	115
III. Modèle animal de lésion excitotoxique .....	116
A. Physiopathologie du modèle choisi .....	116
B. Matériels et méthodes .....	118
C. Résultats .....	125
IV. Modèles animaux d'ischémie cérébrale .....	131
A. Physiopathologie des modèles choisis .....	131
B. Matériels et méthodes .....	133
C. Résultats .....	144

V. Discussion et perspectives .....	155
A. Evaluation du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE dans un modèle de lésion excitotoxique .....	155
B. Evaluation du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE dans des modèles d'ischémie cérébral .....	157
C. Perspective 1 : Application clinique du CLINDE dans l'AVC .....	161
D. Perspective 2 : Poursuite du travail préclinique par des études <i>in vivo</i> en microTEP à l'aide du [ <sup>18</sup> F]-PBR111 .....	162
<b>Conclusion</b> .....	165
<b>Annexes</b> .....	168
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>212</b>

## Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques des différents rayonnements ionisants utilisés en médecine nucléaire.....	25
Tableau II. Principales caractéristiques des récepteurs des benzodiazépines de type central et périphérique (Zisterer & Williams 1997).....	63
Tableau III. Le [ <sup>11</sup> C]-PK11195 a été utilisé en recherche clinique dans une grande variété d'atteintes neurologiques pour détecter la neuroinflammation par imagerie moléculaire.....	79
Tableau IV. Résumé des principaux radioligands de la TSPO : études précliniques ex vivo et in vivo, modèles de neuroinflammation et études cliniques (adapté et actualisé à partir de Chauveau et al 2008). .....	85
Tableau V. Quantification du signal radioactif dans le thalamus et la SNr (Bq/mg).....	153

## Liste des figures

Figure 1. Poudre Tho-Radia, à base de radium et thorium, selon la formule du Dr Alfred Curie.....	27
Figure 2. Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants .....	29
Figure 3. Présentation schématique de la détection par tomographie d'émission de positons. 36	
Figure 4. Le cyclotron installé au sein du CERRP à Tours.....	39
Figure 5. Inhibiteurs radiomarqués de la COX-2 ayant été évalués comme radioligands potentiels TEP ou TEMP. ....	53
Figure 6. L'activation des cellules de la microglie se traduit pas des modifications morphologiques permettant aux cellules de migrer par mouvement amiboïde vers la zone cérébrale atteinte (Stence et al 2001). ....	58
Figure 7. Structure des principaux ligands des récepteurs centraux et périphériques des benzodiazépines. ....	62
Figure 8. Complexe multimérique mitochondrial auquel appartient la TSPO (identifiée ici par son ancienne dénomination de PBR) (James et al 2006). ....	65
Figure 9. Radioanalogues du PK11195 marqués au tritium (1), au carbone 11 (2) et à l'iode 123 (3). ....	70
Figure 10. Images scintigraphiques extraites des études cliniques réalisées avec le [ <sup>11</sup> C]-PK11195. ....	72
Figure 11. La dernière décennie a vu une véritable explosion de nouvelles molécules spécifiques de la TSPO utilisables en imagerie moléculaire TEMP ou TEP. ....	83
Figure 12. Structure chimique du [ <sup>11</sup> C]-VC195 et de la [ <sup>11</sup> C]-Vinpocétine.....	88
Figure 13. Images TEP obtenues chez un même patient atteint de sclérose en plaques avec le [ <sup>11</sup> C]-PK11195 (gauche) et la [ <sup>11</sup> C]-vinpocétine (droite) (Vas et al 2008). ....	89

Figure 14. Structure chimique des composés de la série oxodihydropurine radiomarqués au carbone 11 pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation. ....	90
Figure 15. Images scintigraphiques réalisées 1 heure après l'injection de [ <sup>11</sup> C]-DAA1106 chez un sujet atteint de la maladie d'Alzheimer (Yasuno et al 2008). ....	92
Figure 16. Structure chimique des composés de la série phénoxyaryl-acétamide radiomarqués au carbone 11 ou au fluor 18 pour l'imagerie de la neuroinflammation. ....	94
Figure 17. Structure chimique des composés de la série pyrazolo[1,5-a]pyrimidine radiomarqués au carbone 11 ou au fluor 18 pour l'imagerie de la neuroinflammation. ....	98
Figure 18. Image TEP obtenue 1 heure post-injection de 100 MBq de [ <sup>18</sup> F]-DPA-714 avec (bas) ou sans (haut) pré-injection d'un excès de PK11195 (James et al 2008). ....	99
Figure 19. Structure chimique des composés de la série imidazo-[1,2-a]pyridine pour l'imagerie moléculaire TEP (1, 2) ou TEMP (3, 4) de la neuroinflammation. ....	102
Figure 20. 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-( <i>N,N</i> diethyl)-imidazo[1,2- <i>a</i> ]pyridine-3-acétamide : CLINDE. ....	104
Figure 21. Intensité de la fixation du [ <sup>123</sup> I]-CLINDE dans le SNC, exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu, en fonction du « score clinique » de l'EAE, et effet d'un pré-traitement avec un excès de CLINDE « froid » (Mattner et al 2005). ....	108
Figure 22. Synthèse chimique du précurseur stannique du CLINDE. ....	112
Figure 23. Radiomarquage du CLINDE à l'iode 125 : réaction d'iododéstannylation par substitution électrophile utilisant l'acide peracétique comme oxydant. ....	113
Figure 24. Purification du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE par CLHP. ....	114
Figure 25. Exemples d'excitotoxines agonistes du glutamate administrées par voie intracérébrale pour induire une destruction neuronale par excitotoxicité. ....	117

Figure 26. Principe de détection immunohistochimique de la microglie activée à l'aide de l'anticorps primaire OX-42 dirigé contre le C3, exprimé spécifiquement à la surface des cellules microgliales à l'état activé. ....	123
Figure 27. Biodistribution cérébrale <i>ex vivo</i> du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE .....	126
Figure 28. Images d'autoradiographie <i>ex vivo</i> de la distribution du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE dans le striatum et le cortex.....	128
Figure 30. Immunohistochimie OX-42 (anticorps spécifique de la microglie activée) dans le striatum de rats lésés avec différentes quantités d'AQ. ....	130
Figure 31. Représentation schématique de la technique d'occlusion permanente de l'ACM par électrocoagulation bipolaire (Macrae & Carswell 2006).....	134
Figure 32. Représentation schématique de la technique d'occlusion intraluminaire transitoire de l'ACM (Macrae & Carswell 2006). ....	137
Figure 33. Ischémie cérébrale focale permanente sur souris Swiss induite par électrocoagulation de l'ACM : images de coloration histologique au crésyl-violet (A) et d'autoradiographie <i>ex vivo</i> de la distribution du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE (B) chez la même souris, 3 jours après l'occlusion. ....	144
Figure 34. Cinétique de fixation du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE dans le thalamus ipsilatéral à l'occlusion permanente de l'ACM.....	146
Figure 35. Effets d'un pré-traitement par un excès de PK11195, de CLINDE ou de flumazénil (spécifique des récepteurs centraux aux benzodiazépines) sur la fixation thalamique du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE chez la souris, 15 jours après l'occlusion de l'ACM. ....	148
Figure 36. Images représentatives réalisées dans la lésion primaire corticostriatale après occlusion transitoire de l'ACM de 30 min (rat n°6, volume total d'ischémie = 103 mm <sup>3</sup> ) .....	150
Figure 37. Marquage immunohistochimique anti-NeuN sur lame.....	151

Figure 38. Autoradiographies <i>ex vivo</i> illustrant la fixation du [ <sup>125</sup> I]-CLINDE du côté ipsilatéral à la lésion dans le thalamus (A) et dans la SNr (B).....	152
Figure 40. MicroTEP eXplore VISTA couplée à un scanner (GE-Healthcare), identique à celui utilisé à l'université de Tours .....	163
Figure 41. Purification par CLHP du PBR111 marqué au fluor 18. ....	164

## Liste des annexes

Annexe 1. Liste des articles se rapportant à la thèse.....	169
Annexe 2. Article 1.....	171
Annexe 3. Article 2.....	202

# Glossaire

6-OHDA : 6-hydroxypamine dopaminergique.

AAE : Acide Aminé Excitateur

ACM : Artère Cérébrale Moyenne

AK : Acide Kaïnique

AMPA : acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique

ANSTO : Australian Nuclear Science Technology and Organisation

ANT : Adénine Nucléotide Translocase

AQ : Acide Quinolinique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BP : Binding Potential

Bq : Becquerel

C : Coulomb

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Pression

CBR : Récepteur central aux benzodiazépines

CERRP : Centre d'Etudes et de Recherche sur les RadioPharmaceutiques

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

Ci : Curie

COX-2 : CycloOXygénase-2

CSP : Code de la Santé Publique

DAB : 3,3'-diaminobenzidine

DBI : Diazepam Binding Inhibitor

EAE : Encéphalomyélite Autoimmune

ECG : ElectroCardioGramme

EDC: L,L-ethylenedicysteine

EMA : European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

FDA : Food and Drug Administration

[<sup>18</sup>F]-FDG : [<sup>18</sup>F]Fluoro-deoxyglucose

GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

kDa : kiloDalton

keV : kilo électron-volt

LPS : LipoPolySaccharide

M : mole par litre

MA : Maladie d'Alzheimer

MBR : Mitochondrial Benzodiazepine Receptor

MCI : Mild Cognitive Impairment (déclin cognitif modéré)

MDR: Mitochondrial DBI

NaCl : Chlorure de sodium

NOS : Nitric Oxide Synthase (oxyde nitrique synthétase)

PBBS : Peripheral Benzodiazepine Binding Site

PBR : Peripheral Benzodiazepine Receptor

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)

PFA : paraformaldéhyde

PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PRAX-1 : Peripheral benzodiazépine Receptor Associated protein 1

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

ROI : Region Of Interest

SEP : Sclérose En Plaques

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC : Système Nerveux Central

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

TEMP : Tomographie d'Émission MonoPhotonique

TEP : Tomographie d'Émission de Positons

TNF- $\alpha$  : Tumoral Necrosis Factor – alpha

TSPO : Translocator Protein (Protéine Translocatrice)

UMR : Unité Mixte de Recherche

VDAC : Voltage Dependent Anion Channel

# Introduction

Les pathologies neurologiques représentent un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés dont l'âge moyen de la population est en constante augmentation (Bertram & Tanzi 2005; Ferri et al 2005). Le rôle de la neuroinflammation dans des processus neuropathologiques aigus, comme l'accident vasculaire cérébral ou le traumatisme crânien, ainsi que dans les atteintes neurodégénératives chroniques, comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, est bien décrit dans la littérature (Rojo et al 2008). Dans le processus de neuroinflammation, l'activation de la microglie, cellules immunitaires résidentes du Système Nerveux Central (SNC), est un phénomène précoce et localisé aux aires cérébrales atteintes par la maladie (Kreutzberg 1996). Cette activation microgliale s'accompagne de la surexpression de la protéine translocatrice (TSPO), anciennement nommée récepteur périphérique aux benzodiazépines.

La TSPO est une protéine de 18 kDa appartenant à un complexe multimérique situé dans la membrane externe de la mitochondrie, et est principalement exprimée par les cellules microgliales et plus faiblement par les astrocytes. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, comme la régulation de la synthèse des hormones stéroïdiennes, la prolifération et la différenciation cellulaires, ou encore l'apoptose. La TSPO est prédominante dans les organes périphériques comme le cœur, le rein, ou les glandes corticosurrénales. Au niveau central, elle est également présente à bas bruit dans le parenchyme cérébral normal. Son expression augmente de façon considérable lors de l'activation microgliale, faisant de la TSPO un marqueur moléculaire spécifique de la neuroinflammation. Ainsi, la TSPO représente une cible de grand intérêt dans l'étude du processus inflammatoire cérébral par imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons) ou TEMP (Tomographie d'Emission MonoPhotonique). Ces méthodes imposent de disposer de traceurs spécifiques.

Le PK11195 est un ligand antagoniste spécifique de la protéine translocatrice. Marqué au carbone 11, il constitue actuellement l'outil de référence pour l'exploration de la

neuroinflammation par imagerie moléculaire et a été largement utilisé dans des modèles animaux et chez l'homme, dans diverses pathologies du SNC. Cependant, son manque de sensibilité, son faible rapport "signal spécifique / bruit de fond" *in vivo*, ainsi que les contraintes liées à la courte demi-vie du carbone 11 (20,38 min), limitent son champ potentiel d'utilisation. Par conséquent, plusieurs équipes de recherche développent actuellement de nouveaux radiopharmaceutiques spécifiques de la TSPO marqués au fluor 18 ( $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714,  $[^{18}\text{F}]$ -FEDAA-1106,...) pour l'imagerie TEP ou à l'iode 123 pour l'imagerie TEMP ( $[^{123}\text{I}]$ -CLINDE).

Ce manuscrit est organisé en trois sections. Dans une première partie seront développés les principes de l'imagerie moléculaire ainsi que les propriétés des médicaments radiopharmaceutiques. La deuxième partie de ce travail, consacrée à la neuroinflammation et à son étude par imagerie moléculaire, décrira les cibles physiologiques potentielles ainsi que les outils radiopharmaceutiques existants ou en cours de développement. La troisième partie présentera notre contribution à l'étude de cette problématique en détaillant le travail expérimental effectué au cours de la thèse au sein de l'Equipe 3 « Neurotransmission : de l'imagerie moléculaire à la clinique » de l'UMR Inserm U930 - CNRS ERL 3106 - "Imagerie & Cerveau" de Tours, en collaboration avec le département « Radiopharmaceuticals Research Institute », de « l'Australian Nuclear Science and Technology Organisation », (ANSTO, Sydney, Australie), et le laboratoire CERVOxy du centre CYCERON (Caen, France). Ce travail a comme objectif d'évaluer la capacité du 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-(*N,N* diethyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acetamide ou CLINDE, radioligand marqué à l'iode de haute affinité pour la TSPO, potentiellement utilisable en imagerie TEMP, à refléter l'intensité de la neuroinflammation dans 3 modèles animaux. Le premier est un modèle de lésion excitotoxique unilatérale intrastriatale. Les 2 autres sont des modèles d'ischémie cérébrale focale, réalisée soit par électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne (modèle d'ischémie

permanente), soit par occlusion intraluminale de cette même artère (modèle d'ischémie transitoire). Enfin, nous terminerons ce travail par une discussion générale qui reprend les principaux résultats obtenus et replace, au travers des exemples de modèles animaux choisis, l'apport de l'imagerie moléculaire dans l'étude et la compréhension de la neuroinflammation associée aux maladies neurologiques.

Première partie  
Imagerie Moléculaire et Médicament  
Radiopharmaceutique

# I. Principes de l'Imagerie moléculaire

## A. Notions de physique nucléaire - radioactivité

### *1. Radioactivité*

#### *1.1 Définition*

La radioactivité, terme inventé vers 1898 par Pierre Curie, est un phénomène physique naturel au cours duquel des noyaux atomiques instables se désintègrent en dégageant de l'énergie sous forme de rayonnements divers, pour se transmuter en des noyaux atomiques plus stables. Les rayonnements ainsi émis sont appelés, selon le cas, des rayons  $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (bêta), ou  $\gamma$  (gamma). Les radioéléments les plus fréquents dans les roches terrestres sont l'isotope 238 de l'uranium ( $^{238}\text{U}$ ), l'isotope 232 du thorium ( $^{232}\text{Th}$ ), et surtout l'isotope 40 du potassium ( $^{40}\text{K}$ ). On appelle isotopes des atomes ayant le même numéro atomique  $Z$  mais des nombres de masse  $A$  différents. Ce sont des atomes d'un même élément, ayant les mêmes propriétés chimiques et biologiques. Ils ne diffèrent que par leur nombre de nucléons et n'ont pas les mêmes propriétés physiques. Outre ces isotopes radioactifs naturels encore relativement abondants, il existe dans la nature des isotopes radioactifs beaucoup plus rares. Il s'agit notamment des éléments instables produits à la suite de désintégrations des isotopes mentionnés, par exemple de divers isotopes du radium et du radon. Un des radioéléments naturels les plus utilisés par l'homme est l'isotope 235 de l'uranium ( $^{235}\text{U}$ ) qui se trouve dans la nature en concentration très faible, associé à l'isotope  $^{238}\text{U}$ , mais dont on modifie la proportion par des techniques d'enrichissement pour qu'il puisse servir à la production d'énergie nucléaire civile et militaire. Un autre radioélément naturel est l'isotope 14 du carbone ( $^{14}\text{C}$ ). Ce dernier est constamment produit dans la haute atmosphère par des rayons cosmiques interagissant avec l'azote, et se détruit par désintégrations radioactives à peu près

au même taux qu'il apparaît, de sorte qu'il se produit un équilibre dynamique qui fait que la concentration du  $^{14}\text{C}$  reste plus ou moins constante au cours du temps dans l'air et dans les organismes vivants qui respirent cet air. Une fois un organisme mort, la concentration en  $^{14}\text{C}$  diminue dans ses tissus, et permet de dater le moment de la mort. Cette datation au carbone 14 est un outil de recherche très prisé par les historiens et permet de dater avec une bonne précision des objets organiques dont l'âge ne dépasse pas cinquante à cent mille ans.

### *1.2 Caractéristiques d'un noyau d'atome*

La représentation symbolique du noyau d'un atome est:  ${}^A_Z\text{X}$

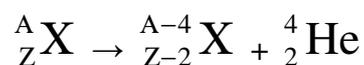
Où :

- X est le symbole de l'élément chimique de numéro atomique Z.
- Z est le nombre de protons. Z est aussi appelé nombre de charge.
- A est le nombre de nucléons. A est aussi appelé nombre de masse.
- $N = A - Z$  est le nombre de neutrons présents dans le noyau.

### *1.3 Les différents types de rayonnement*

#### **a. Rayonnement $\alpha$**

On parle de radioactivité  $\alpha$  pour désigner l'émission d'un noyau d'hélium :



### **b. Rayonnement $\beta^-$**

La radioactivité  $\beta^-$  affecte les nucléides présentant un excès de neutrons. Elle se manifeste par la transformation dans le noyau d'un neutron en proton, le phénomène s'accompagnant de l'émission d'un électron (ou particule  $\beta^-$ ) et d'un antineutrino  $\bar{\nu}$  :



### **c. Rayonnement $\beta^+$**

La radioactivité  $\beta^+$  concerne les nucléides qui présentent un excès de protons. Elle se manifeste par la transformation dans le noyau d'un proton en neutron, le phénomène s'accompagnant de l'émission d'un positon (encore appelé particule  $\beta^+$ ) et d'un neutrino  $\nu$  :



### **d. Rayonnement $\gamma$**

Un noyau atomique qui ne souffre pas d'un déséquilibre baryonique (rapport entre nombre de protons et de neutrons), mais qui se trouve dans un état d'énergie instable, émet lors de transitions électroniques à partir de niveaux d'énergie excités un photon très énergétique, donc très pénétrant, pour atteindre un état d'énergie stable. Les rayons X et les photons  $\gamma$  sont 2 rayonnements très similaires, que seule leur source différencie (le rayonnement  $\gamma$  est d'origine nucléaire, alors que les rayons X proviennent d'un réarrangement du cortège électronique de l'atome).

Les caractéristiques de ces rayonnements ionisants sont présentées dans le Tableau I.

**Tableau I. Caractéristiques des différents rayonnements ionisants utilisés en médecine nucléaire**

Emission	Nature	Symbole en physique nucléaire	Masse approchée (u*)	Charge (e**)
Particule $\alpha$	particulaire : noyau d'hélium	${}^4_2\text{He}$	4,00150 u	+ 2 e
Particule $\beta^-$	particulaire : électron $e^-$	${}^0_{-1}e$	0,000549 u	- e
Particule $\beta^+$	particulaire : positon $e^+$	${}^0_1e$	0,000549 u	+ e
Rayon $\gamma$	rayonnement électromagnétique	$\gamma$	0	0

\* En physique nucléaire, on utilise souvent l'unité de masse atomique  $1 \text{ u} = 1,6605 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ .

\*\* charge élémentaire  $e = 1,6002 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

## 2. Historique

La radioactivité fut découverte en 1896 par Henri Becquerel (1852-1908), lors de ses travaux sur la phosphorescence : les matières phosphorescentes émettent de la lumière dans le noir après exposition à la lumière, et Becquerel supposait que la lueur qui se produit dans les tubes cathodiques exposés aux rayons X pouvait être liée au phénomène de phosphorescence. Son expérience consistait à sceller une plaque photographique dans du papier noir et mettre ce paquet en contact avec différents matériaux phosphorescents. Tous ses résultats d'expérience furent négatifs, à l'exception de ceux mettant en cause des sels d'uranium, lesquels impressionnaient la plaque photographique à travers la couche de papier. Cependant, il apparut bientôt que l'impression de l'émulsion photographique n'avait rien à voir avec le phénomène de phosphorescence, car l'impression se faisait même lorsque l'uranium n'avait

pas été exposé à la lumière au préalable. Par ailleurs, tous les composés d'uranium impressionnaient la plaque, y compris les sels d'uranium non phosphorescents et l'uranium métallique. À première vue, ce nouveau rayonnement était semblable au rayonnement X, découvert l'année précédente (en 1895) par le physicien allemand Wilhelm Röntgen (1845-1923). Des études ultérieures menées par Becquerel lui-même, ainsi que par Marie Curie (1867-1934) qui, sur le conseil de son mari Pierre Curie (1859-1906), fit de la radioactivité le sujet de sa thèse de doctorat, montraient que la radioactivité est nettement plus complexe que le rayonnement X. En particulier, ils trouvaient qu'un champ électrique ou magnétique sépare les rayonnements « uraniques » en trois faisceaux distincts, qu'ils baptisèrent  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La direction de la déviation des faisceaux montrait que les particules  $\alpha$  étaient chargées positivement, les  $\beta$  négativement, et que les  $\gamma$  étaient neutres. En outre, la magnitude de la déflexion indiquait nettement que les particules  $\alpha$  étaient bien plus massives que les  $\beta$ . Par la suite, on découvrit que de nombreux autres éléments chimiques ont des isotopes radioactifs. Ainsi, en traitant des tonnes de pechblende, une roche uranifère, Marie Curie réussit à isoler quelques milligrammes de radium dont les propriétés chimiques sont tout à fait similaires à celles du baryum (les deux sont des métaux alcalino-terreux), mais qu'on arrive à distinguer à cause de la radioactivité du radium.

Les dangers de la radioactivité pour la santé ne furent pas immédiatement reconnus. Ainsi, Nikola Tesla (1856-1943), en soumettant volontairement en 1896 ses propres doigts à une irradiation par des rayons X, constata que les effets aigus de cette irradiation étaient des brûlures qu'il attribua, dans une publication, à la présence d'ozone. D'autre part, les effets mutagènes des radiations, en particulier les risques de cancer, ne furent découverts qu'en 1927 par Hermann Joseph Muller (1890-1967).



**Figure 1. Poudre Tho-Radia, à base de radium et thorium, selon la formule du Dr Alfred Curie...**

Avant que les effets biologiques des radiations ne soient connus, des médecins et des sociétés attribuaient aux matières radioactives des propriétés thérapeutiques : le radium, en particulier, était populaire comme tonifiant, et fut prescrit sous forme d'amulettes ou de pastilles (Figure 1). Marie Curie s'est élevée contre cette mode, arguant que les effets des radiations sur le corps n'étaient pas encore bien compris. Durant les années 1930, les nombreuses morts qui ont semblé pouvoir être reliées à l'utilisation de produits contenant du radium ont fait passer cette mode.

### ***3. Interaction des rayonnements avec la matière – pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants***

Les rayonnements  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont dits rayonnements ionisants : ils interagissent avec la matière en provoquant des ionisations et des excitations. La façon dont se produisent ces ionisations dépend du type de rayonnement considéré.

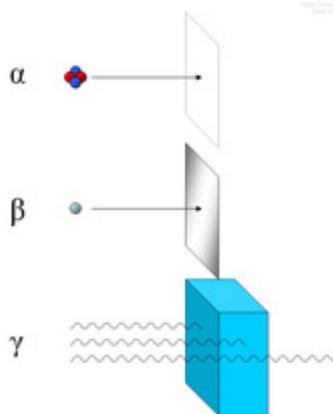
Le rayonnement,  $\gamma$  est un faisceau de photons sans charge ni masse. En traversant la matière il provoque trois types d'interactions : l'effet photo-électrique, la création de paires et l'effet Compton. Ces mécanismes produiront, *in fine*, des excitations et ionisations dans le

matériau traversé. Le rayonnement  $\gamma$  a un fort pouvoir de pénétration dans la matière (plusieurs dizaines de mètres de béton), et peut donc sortir du corps humain et être détecté en imagerie scintigraphique.

Le rayonnement  $\alpha$  est un faisceau de particules lourdes et chargées, généralement d'énergie élevée. En traversant la matière, ce faisceau de particules percute les électrons de la périphérie des atomes du matériau traversé ce qui les excite ou les ionise. Ce mécanisme se produit sur une très courte distance : le pouvoir de pénétration des rayonnements  $\alpha$  est faible (une simple feuille de papier les arrête totalement) et par conséquent le dépôt d'énergie par unité de longueur traversée, on parle de transfert d'énergie linéique (TEL), est élevé.

Le rayonnement  $\beta$ , constitué d'électrons ou de positons, est un faisceau de particules légères et chargées. Il interagit avec la matière en provoquant, lui aussi, des excitations et des ionisations. Le parcours des électrons et des positons dans la matière est plus important que celui des particules  $\alpha$  et le TEL du rayonnement  $\beta$  est inférieur à celui du rayonnement  $\alpha$ . Il en est donc de même du nombre d'excitations et d'ionisations produites par unité de longueur. Le rayonnement  $\beta$  est facilement arrêté par la matière (il est arrêté par une feuille d'aluminium) ; il ne sort donc pas du corps humain et ne permet pas d'obtenir directement des images scintigraphiques. Il est en revanche utilisé en radiothérapie métabolique.

La nature des lois physiques permettant de calculer les parcours ou l'atténuation des rayonnements dans la matière diffèrent selon les rayonnements considérés. Les rayonnements  $\gamma$  ne sont jamais complètement arrêtés par la matière. C'est pourquoi le flux de photons émergeant d'un écran sera faible, voire quasi indétectable, mais jamais nul. Les lois physiques qui traduisent le parcours des rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$  montrent qu'au-delà d'une certaine distance, il est impossible que des particules puissent être retrouvées. Le rayonnement incident peut donc être complètement bloqué par un matériau qui joue le rôle d'écran (Figure 2).



**Figure 2. Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants**

#### ***4. Loi de désintégration radioactive – Notion de période radioactive***

Un radionucléide quelconque a autant de chances de se désintégrer à un moment donné qu'un autre radionucléide de la même espèce, et la désintégration ne dépend pas des conditions physico-chimiques dans lesquelles le nucléide se trouve. En d'autres termes, la loi de désintégration radioactive est une loi statistique. Soit  $N(t)$  le nombre de radionucléides d'une espèce donnée présents dans un échantillon à un instant  $t$ . Comme la probabilité de désintégration de ces radionucléides ne dépend pas de la présence des autres radionucléides ni du milieu environnant, le nombre total de désintégrations  $dN$  pendant un laps de temps  $dt$  à l'instant  $t$  est proportionnel au nombre de radionucléides de même espèce  $N$  présents et à la durée  $dt$  de cet intervalle : c'est une loi de décroissance exponentielle. On a en effet :

$$dN = -\lambda N dt$$

où la constante de proportionnalité  $\lambda$ , appelée constante radioactive du radionucléide considéré, possède la dimension de l'inverse d'un temps. On met le signe moins (-) parce que N diminue au cours du temps, de sorte que la constante  $\lambda$  est positive.

En intégrant l'équation différentielle précédente, on trouve le nombre N(t) de radionucléides présents dans le corps à un instant t quelconque, sachant qu'à un instant donné t = 0 il y en avait N<sub>0</sub> :

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$$

On appelle « période radioactive » (ou demi-vie, t<sub>1/2</sub>) le temps au bout duquel l'activité d'un échantillon est diminuée de moitié.

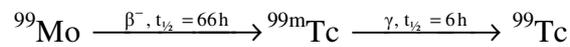
On a donc :

$$N_0/2 = N_0 e^{-\lambda t_{1/2}} \rightarrow e^{-\lambda t_{1/2}} = 1/2 \rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Dans le cas particulier où un élément radioactif A se désintègre en un élément B, lui-même radioactif, pour donner l'élément stable C, avec des constantes radioactives  $\lambda$  et  $\lambda'$  pour A et B, respectivement, la loi de décroissance radioactive de l'élément fils B doit tenir compte pendant un intervalle de temps dt à la fois de la formation de B à partir de la décroissance de A, et de la propre décroissance radioactive de B. Le nombre de radionucléides B présents à un instant t suit alors la loi suivante :

$$N_B(t) = \frac{\lambda}{\lambda' - \lambda} N_A(0) (e^{-\lambda t} - e^{-\lambda' t})$$

Le technétium 99 métastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ), le radionucléide le plus utilisé à l'heure actuelle en médecine nucléaire, suit cette loi de décroissance particulière car il est obtenu à partir d'un autre élément radioactif, le molybdène 99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), à partir du schéma de désintégration suivant :



## 5. Activité et activité spécifique

### 5.1 L'activité

L'activité d'une source radioactive, notée A, traduit la vitesse avec laquelle les atomes radioactifs se désintègrent. L'unité internationale d'activité est le Becquerel (Bq), unité qui correspond au nombre de désintégrations en 1 seconde, en hommage à Henri Becquerel. L'ancienne unité était le Curie (Ci), qui se définit comme l'activité d'un gramme de radium, soit  $37 \times 10^9$  désintégrations par seconde ( $37 \text{ Bq} = 1 \text{ nCi}$ ).

L'activité au temps t d'un échantillon donné est égale au produit du nombre total N d'atomes du radioélément existants à l'instant t, par la constante  $\lambda$  du radioélément :

$$A(t) = \lambda N(t)$$

L'activité d'un nombre donné d'atomes d'un isotope radioactif est donc proportionnelle à ce nombre et inversement proportionnelle à la période radioactive de l'isotope.

### **5.2 L'activité spécifique**

C'est l'activité par unité de masse. Cette donnée est très importante pour la quantification des images scintigraphiques car elle permet de relier la mesure du signal radioactif détecté à une quantité de matière de radiopharmaceutique.

## **B. Imagerie moléculaire : application à la médecine nucléaire**

L'imagerie moléculaire est une discipline associant la biologie moléculaire et cellulaire et l'imagerie *in vivo* non invasive. En permettant de visualiser, au delà de la structure des organes et des tissus, les molécules présentes dans les cellules, l'imagerie moléculaire crée les conditions pour comprendre le fonctionnement de l'organisme sans le perturber et ouvre une nouvelle ère en biologie et en médecine.

La médecine nucléaire utilise et applique dans le domaine médical les principes de l'imagerie moléculaire. Elle appartient donc aux disciplines d'imagerie médicale, au même titre que l'imagerie à résonance magnétique (IRM), la radiographie à rayons X, le scanner, ou encore l'échographie. En imagerie médicale, le choix de l'outil diagnostique à employer dépend de la question posée par le clinicien, et ces différentes disciplines sont d'avantage complémentaires que concurrentes. Ainsi, l'IRM, qui possède une très bonne résolution spatiale (de l'ordre du millimètre), est avant tout une méthode anatomique extrêmement précise mais devient aussi actuellement une méthode d'analyse fonctionnelle, à l'échelle des organes et des tissus. L'imagerie moléculaire permet quant à elle d'accéder à la visualisation du fonctionnement des cellules et d'étudier les processus pathologiques *in situ* à l'échelle

moléculaire. Ses principales applications médicales concernent la cancérologie, la neurologie et les maladies cardiovasculaires. Elle permet d'améliorer le diagnostic initial et le suivi de ces pathologies, d'en étudier la physiopathologie, ou encore d'évaluer de nouveaux traitements.

En médecine nucléaire, des produits radioactifs, sous forme de sources non scellées, sont administrés au patient, par injection, inhalation ou ingestion, dans un but diagnostique ou thérapeutique. Les atomes radioactifs, appelés radionucléides, peuvent présenter une biodistribution intrinsèque permettant la visualisation d'un organe ou d'une fonction. C'est par exemple le cas de l'iode 123 et du Thallium 201, dédiés respectivement à la scintigraphie de la thyroïde et du cœur. En général, ces formulations chimiques inorganiques très simples ne permettent l'imagerie que de quelques tissus ou caractéristiques fonctionnelles. Pour autoriser des explorations plus fines, plus spécifiques d'un organe ou d'une pathologie, il est nécessaire d'intégrer l'élément radioactif à une structure organique qui servira donc de vecteur et déterminera tout ou partie du tropisme de la molécule radioactive ainsi constituée (Rudin & Weissleder 2003; Weissleder & Mahmood 2001).

Deux techniques d'imagerie sont à l'heure actuelle employées en médecine nucléaire : la Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) et la Tomographie d'Emission de Positons (TEP). Leur spécificité réside dans la nature du rayonnement émis par le radionucléide utilisé.

### ***1. La Tomographie d'émission monophotonique (TEMP)***

La TEMP, également appelée scintigraphie  $\gamma$ , nécessite d'administrer au patient un radiopharmaceutique contenant un radionucléide émetteur de rayonnements  $\gamma$ , et une gamma-caméra.

La gamma-caméra est constituée de plusieurs éléments qui permettent de transformer le signal photonique en impulsions électriques, puis en image. Les photons  $\gamma$  étant émis dans toutes les directions de l'espace, un collimateur, positionné à l'entrée de la tête de détection de la caméra, sélectionne ceux dont l'incidence est perpendiculaire au détecteur, afin de localiser le lieu d'émission du rayonnement. Une correction d'atténuation, prenant en compte l'épaisseur de tissu traversé par le rayonnement dans le patient, peut être réalisée par rotation de la tête de détection de la caméra autour du patient. Les photons  $\gamma$  de haute énergie collimatés rencontrent un détecteur à scintillation, constitué d'un cristal d'iodure de sodium avec des traces de thallium (0,1%), et sont convertis en photons lumineux d'énergie moindre. Ces photons lumineux sont ensuite collectés au niveau d'une photocathode qui émet des électrons en proportion de l'intensité du signal reçu ; les électrons sont accélérés puis entrent dans un photomultiplicateur qui amplifie le signal par un système de dynodes en série. L'impulsion électrique émise par la dernière dynode, appelée anode, est proportionnelle au nombre d'électrons initiaux et donc aux photons  $\gamma$  incidents. Le signal est alors analysé informatiquement afin de reconstruire une image reproduisant la distribution de la radioactivité chez le patient.

La qualité de l'image obtenue dépend de l'énergie des photons  $\gamma$  : une gamma-caméra est conçue pour détecter les rayonnements émis dans une certaine fenêtre d'énergie, généralement comprise entre 100 et 250 keV. Les radionucléides émettant à des énergies trop faibles ne permettent pas une sensibilité de détection correcte (les photons de basse énergie sont arrêtés par les tissus), alors que les rayonnements d'énergie  $> 250$  keV sont difficiles à collimater, et, dans les 2 cas, les images obtenues sont de qualité insuffisante. Les radionucléides émetteurs  $\gamma$  les plus couramment utilisés en médecine nucléaire sont le technétium 99m (demi-vie : 6,02 h) et l'iode 123 (demi-vie : 13,3 h) qui ont des énergies de rayonnement respectives de 140 keV et 159 keV.

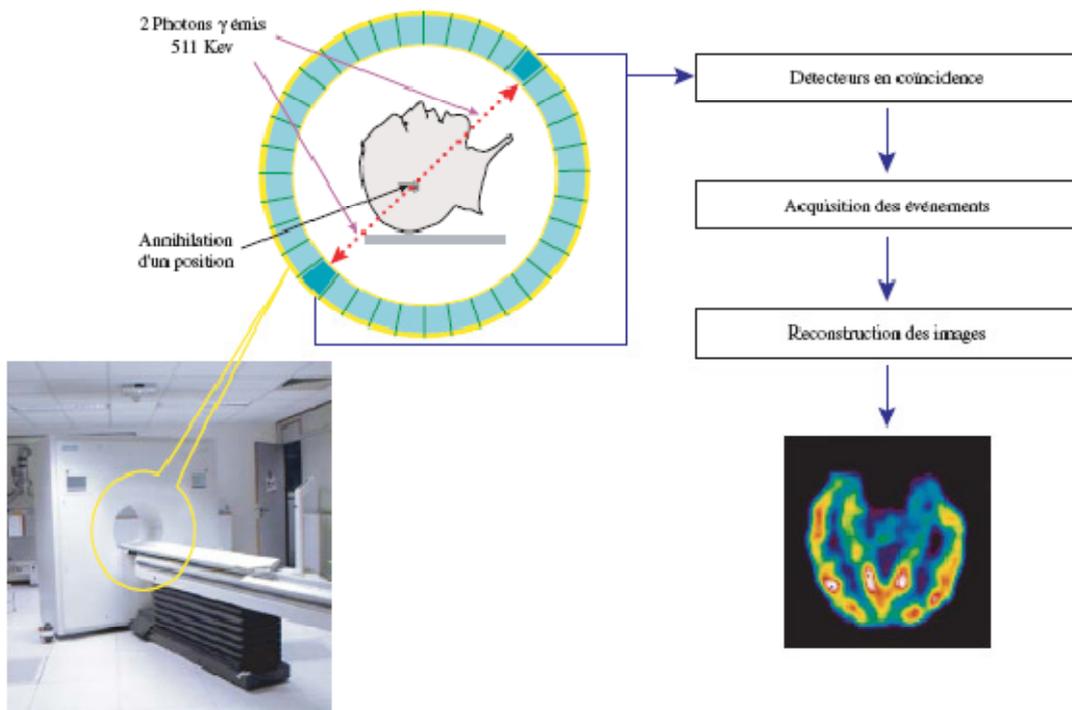
## ***2. Tomographie d'émission de positons (TEP)***

La TEP utilise des radiopharmaceutiques marqués avec un radionucléide émetteur d'électrons positifs  $\beta^+$ , encore appelés positons (particule dont la masse et le spin sont identiques à ceux d'un électron, mais dont la charge est positive), et une caméra TEP, généralement couplée à un scanner permettant un repérage anatomique (on parle de PETScan) pour réaliser l'imagerie du patient.

Les radionucléides émetteurs de positons utilisables en imagerie moléculaire se caractérisent par une courte demi vie (Fluor 18 : 109,8 min ; Carbone 11 : 20,4 min, Azote 13 : 9,96 min et Oxygène 15 : 124 sec), ce qui nécessite que les étapes de production par un cyclotron, de radiomarquage de la molécule d'intérêt biologique par le radionucléide, de formulation du médicament radiopharmaceutique obtenu et de son administration au patient soient réalisées le plus rapidement possible.

Après un court trajet dans l'organisme (quelques millimètres), le positon interagit avec un électron, pour former un positronium. La demi-vie de ce positronium est d'environ 100 nanosecondes, son existence se terminant avec une annihilation électron-positron. La masse totale du positronium disparaît et est convertie en énergie. Ainsi, 1022 keV sont produits sous forme de 2 photons gamma de 511 keV chacun, émis dans des directions opposées (à 180° l'un de l'autre). Ces rayonnements  $\gamma$  sont captés par l'anneau de détection de la caméra TEP, entourant le patient, et constitué d'une juxtaposition de détecteurs à scintillation. Quand 2 photons rencontrent 2 détecteurs positionnés à 180° l'un de l'autre dans une fenêtre temporelle restreinte ( $\approx$  10 nanosecondes), appelée fenêtre de coïncidence, on admet qu'ils résultent de la désintégration du même atome, localisé sur la ligne droite passant par les 2 détecteurs. C'est la superposition de toutes les lignes obtenues par détection simultanée de 2

photons en coïncidence qui aboutit à la reconstruction d'une l'image scintigraphique en 3 dimensions, image représentant la distribution quantitative du radioélément dans l'organisme. L'utilisation d'un collimateur n'est plus nécessaire, ce qui augmente la sensibilité et la résolution de la détection par rapport à la TEMP, et donc la qualité de l'image.



**Figure 3. Présentation schématique de la détection par tomographie d'émission de positons.**

### ***3. Traitement des images – Tomographie***

Une image scintigraphique représente en fait la distribution d'un atome radioactif dans l'organisme. Chaque point de l'image est appelé un « pixel ». Il contient une valeur numérique égale au nombre de photons détectés. De nombreux paramètres quantitatifs peuvent être calculés à partir des valeurs des pixels, c'est la quantification.

On peut enregistrer des images selon différents types d'acquisition :

- acquisition planaire statique : les têtes de détection sont immobiles ; une seule image est acquise. C'est le principe de la photographie.

- acquisition planaire dynamique : les têtes de détection sont immobiles ; plusieurs dizaines d'images sont successivement acquises, à raison de quelques secondes par image. C'est le principe du cinéma. On veut ici connaître la cinétique de distribution du radiopharmaceutique. Les enregistrements dynamiques permettent d'obtenir des courbes fonctionnelles, et d'en extraire des paramètres quantitatifs temporels comme par exemple le temps de vidange gastrique ou la fonction rénale.

- acquisition planaire synchronisée : ce type d'acquisition est utilisé pour les études cardiaques. L'acquisition est similaire à la précédente, mais elle démarre à un instant particulier du cycle cardiaque, et 16 images sont généralement acquises durant chaque cycle. Le cycle cardiaque est connu grâce à la pose d'électrodes ECG.

- acquisition tomographique : les têtes de détection sont en rotation autour du sujet. Plusieurs dizaines d'images sont successivement acquises, chacune sous un angle différent. On veut connaître la répartition du radiopharmaceutique dans les trois dimensions de l'espace.

- acquisition tomographique synchronisée : comme pour l'acquisition tomographique simple, les têtes sont en rotation autour du sujet. Sous chaque angle de prise de vue, sont réalisées des acquisitions synchronisées avec le cycle cardiaque. On obtient ainsi la répartition de la radioactivité en trois dimensions, au cours du cycle cardiaque.

La TEMP n'autorise actuellement qu'une mesure semi-quantitative de la fixation d'une molécule radiomarquée, en calculant le rapport de fixation entre une région d'intérêt où la molécule présente une fixation spécifique élevée sur sa cible (ROI : Region Of Interest) et

une région de référence où la molécule se fixe de façon non spécifique. Ce rapport permet d'estimer le potentiel de liaison du radiopharmaceutique sur sa cible.

La TEP présente l'avantage de permettre des mesures quantitatives précises de la fixation du radiopharmaceutique, grâce à des modèles pharmacocinétiques et des algorithmes de reconstruction adaptés. De plus, la caméra TEP est souvent couplée à une autre technique d'imagerie donnant une image morphologique, comme le scanner. La fusion des deux images ainsi obtenues permet une meilleure localisation anatomique de la fixation du radiopharmaceutique. Néanmoins, les applications de la TEP dans le secteur médical restaient limitées du fait de son coût et des infrastructures nécessaires (cyclotron pour la production de radioisotopes, automate de synthèse radiochimique, caméra TEP, support informatique pour l'acquisition et le traitement des images et locaux adaptés).

Depuis quelques années, l'essor du fluor 18, avec la mise sur le marché du [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoro-deoxyglucose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) permet d'envisager une utilisation beaucoup plus importante de la scintigraphie TEP. Le fluor 18 possède une période de presque 2 heures qui rend envisageable sa distribution dans les centres hospitaliers et les instituts de recherche situés dans un périmètre d'environ 200 km du lieu de production. Ainsi, l'implantation de nouveaux centres TEP en France devrait permettre de développer considérablement les applications cliniques de la TEP. La ville de Tours dispose depuis janvier 2008 d'un cyclotron installé à Tours-Nord (partenariat entre la société Cyclopharma et les chercheurs de l'Université et du CHU de Tours (UMR Inserm U930) au sein du CERRP (Centre d'Etudes et de Recherche sur les RadioPharmaceutiques), Figure 4).



**Figure 4. Le cyclotron installé au sein du CERRP à Tours**

## **II. Le Médicament Radiopharmaceutique**

### **A. Définition et dispositions légales**

L'article L-5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP) définit le médicament comme : *« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».*

Depuis la loi 92-1279 du 8 Décembre 1992, parue au journal officiel le 11 Décembre 1992 et modifiée par la loi n° 2007-248 du 26 février 2007 art. 4, les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire ont le statut de médicament à part entière, et à ce titre sont soumis aux mêmes exigences que tous les autres médicaments. La politique des produits

pharmaceutiques hospitaliers s'applique donc aux médicaments radiopharmaceutiques, trousse, générateurs et précurseurs, définis par cette loi de la manière suivante :

« On entend par :

- *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 ;*
- *Générateur : tout système contenant un radionucléide parent déterminé servant à la production d'un radionucléide de filiation obtenu par élution ou par toute autre méthode et utilisé dans un médicament radiopharmaceutique ;*
- *Trousse : toute préparation qui doit être reconstituée ou combinée avec des radionucléides dans le produit radiopharmaceutique final ;*
- *Précurseur : tout autre radionucléide produit pour le marquage radioactif d'une autre substance avant administration. »*

Les médicaments radiopharmaceutiques, qu'ils soient à visée diagnostique ou thérapeutique, livrés prêts à l'emploi ou préparés sur place, doivent satisfaire d'un point de vue juridique à la fois aux exigences pharmaceutiques d'un médicament, mais aussi à celles concernant la détention, la manipulation et l'élimination des produits radioactifs.

## **B. Caractéristiques d'un médicament radiopharmaceutique**

Un médicament radiopharmaceutique est constitué de deux éléments :

- un (ou plusieurs) isotope(s) radioactif(s), dénommé(s) radionucléide(s).
- une molécule d'intérêt biologique, nommée vecteur.

Pour certains radiopharmaceutiques, l'isotope radioactif joue également le rôle de vecteur (exemples de l'iode 123 et du Thallium 201, dédiés respectivement à la scintigraphie de la thyroïde et du cœur, cités plus haut). Afin que le radiopharmaceutique permette d'effectuer une exploration fonctionnelle précise, chacune de ces 2 composantes doit répondre à certains critères indispensables.

### ***1. Le vecteur***

La médecine nucléaire utilise une large gamme de vecteurs de structures chimiques très différentes : des atomes, des ions, des molécules et macromolécules, des colloïdes, des anticorps et même des cellules entières. La distribution de la radioactivité dans l'organisme dépend exclusivement des propriétés pharmacocinétiques et pharmacologiques du vecteur, qui conditionnent donc la qualité de l'image ou du traitement.

#### ***1.1 Caractérisation in vitro***

Des paramètres quantitatifs déterminés *in vitro* permettent de caractériser un vecteur, également appelé ligand, vis à vis de sa cible biologique :

### a. Affinité de la liaison

Des expériences de saturation de la liaison à l'équilibre d'un ligand à son récepteur permettent d'en déterminer l'affinité, qui traduit le potentiel de la liaison vecteur – cible. Il s'agit de mesurer la liaison spécifique à l'équilibre, lors de l'incubation de concentrations variables de ligand radioactif, avec une quantité fixe de récepteur (par exemple une population de cellules entières exprimant un récepteur, ou bien quelques  $\mu\text{g}$  d'une préparation de membranes cellulaires).

La représentation de Scatchard, lorsque l'on se place à l'équilibre, permet de déterminer 2 paramètres caractérisant la liaison spécifique d'un ligand pour son récepteur : le  $K_d$  et le  $B_{\text{max}}$ , à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{B_{\text{max}}}{K_d}$$

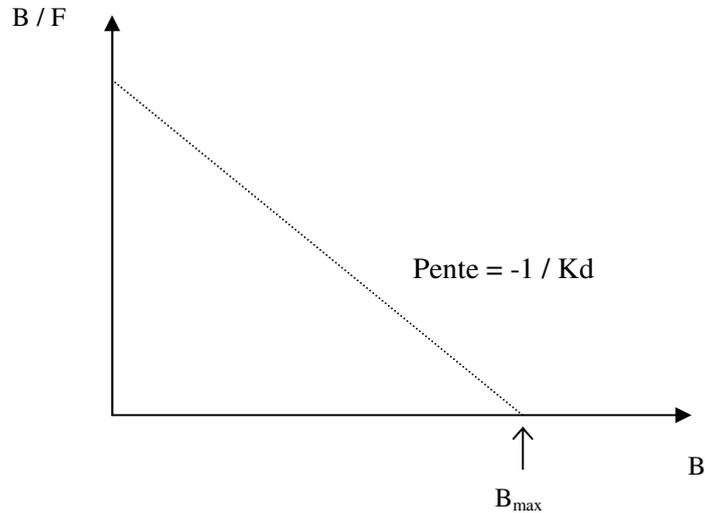
Avec :

- F : concentration de ligand libre : F = Free

- B : concentration de récepteurs occupés par le ligand : B = Bound

Le  $K_d$  est la constante de dissociation à l'équilibre, définie comme la concentration en ligand qui occupe la moitié des sites de fixation. Elle reflète l'affinité d'un ligand pour sa cible : plus le  $K_d$  est faible, plus l'affinité du ligand pour son récepteur est forte. Le  $B_{\text{max}}$  est la concentration totale de sites de liaison du ligand.

Représentation des résultats selon Scatchard  $B/F = f(B)$ :



- L'axe des abscisses représente la liaison spécifique B (" Bound ").
- L'axe des ordonnées représente la liaison spécifique divisée par la concentration en ligand libre B/F (F, " Free ")

La représentation selon Scatchard permet de déterminer le  $K_d$  et le  $B_{max}$  :

- $K_d$  = opposé de l'inverse de la pente.
- $B_{max}$  = intersection de la droite avec l'axe des abscisses.

### **b. Sélectivité de la liaison**

Pour connaître la sélectivité d'un ligand pour un récepteur ou transporteur déterminé par rapport à d'autres cibles moléculaires, on réalise des études de compétition.

L'expérience consiste à quantifier le déplacement d'un ligand radiomarqué spécifique du récepteur étudié par le ligand étudié, non radioactif, appelé compétiteur. On mesure la liaison spécifique d'une concentration donnée (en général égale au  $K_d$ ) en ligand radiomarqué à l'équilibre en présence d'une concentration variable et croissante (par exemple  $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M) de compétiteur froid.

Cette méthode par compétition permet de calculer le  $K_i$ , constante d'inhibition de la fixation du ligand donné, sur un récepteur donné, par le compétiteur étudié. Elle est calculée à partir de l' $IC_{50}$  qui est la concentration en compétiteur nécessaire pour inhiber 50% de la fixation du ligand radiomarqué. C'est la comparaison des  $K_i$  obtenus pour chaque cible étudiée qui permet de connaître la sélectivité d'un ligand pour un récepteur donné, par rapport à d'autres sites potentiels de fixation.

Les résultats d'affinité et de sélectivité d'un ligand, mesurés *in vitro*, permettent de sélectionner les molécules potentiellement intéressantes pour l'*in vivo*.

## ***1.2 Caractéristiques pharmacodynamiques in vivo***

### **a. Métabolisme**

Comme pour tout médicament administré au patient, un radiopharmaceutique peut être substrat de réactions enzymatiques de métabolisation. Afin que le radionucléide reste couplé au vecteur *in vivo*, sa position sur le vecteur se révèle d'une grande importance. De plus, il faut s'assurer que le signal radioactif est bien dû à la molécule administrée, et non pas à d'éventuels métabolites, ce qui peut perturber l'interprétation de l'examen et induit des risques de radiotoxicité.

## **b. Période effective**

On définit la période effective ( $T_e$ ) comme étant le temps au bout duquel l'activité administrée au patient est diminuée de moitié. Elle prend en compte la période physique ( $t_{1/2}$ ) du radionucléide et la période biologique  $T_b$  du radiopharmaceutique, qui traduit la vitesse avec laquelle l'organisme élimine la molécule administrée.  $T_e$  est liée à  $t_{1/2}$  et  $T_b$  par la formule :

$$\frac{1}{T_e} = \frac{1}{t_{1/2}} + \frac{1}{T_b}$$

Un bon vecteur marqué doit avoir une  $T_e$  assez longue pour ne pas être éliminé avant la fin de l'examen, mais assez courte pour réduire au maximum l'irradiation de l'organisme. Pour le diagnostic, une  $T_e$  de l'ordre de quelques heures est recherchée.

## ***2. Le radionucléide***

Le choix du radioélément se fait en fonction de l'utilisation diagnostique (rayonnements  $\gamma$  primaires ou secondaires suite à l'annihilation d'un rayonnement  $\beta^+$ ) ou thérapeutique (rayonnements  $\beta^-$  peu pénétrants mais très ionisants) du médicament radiopharmaceutique et dépend de nombreux paramètres : nature et énergie du rayonnement émis, demi-vie, encombrement stérique, activité spécifique du radioélément, ou encore nature du vecteur et caractéristiques de la réaction de marquage.

### ***3. Notions de radiochimie***

L'application des principes de la chimie organique pour le marquage de molécules vectrices spécifiques d'une cible moléculaire ou d'une fonction biologique par un radionucléide sans les dénaturer a donné naissance à une chimie particulière, dénommée la radiochimie. A l'exception des radionucléides utilisés tels quels, l'étape de marquage est prépondérante dans la préparation d'un médicament radiopharmaceutique. L'appartenance chimique du radionucléide à l'une ou l'autre des 2 catégories d'éléments de la classification périodique de Mendeleïev détermine 2 types de radiochimie : celle des métaux et celle des non-métaux.

Les non-métaux (fluor 18, iode 123, carbone 11,...) sont des radioéléments que l'on peut incorporer au vecteur par 1, voire 2 liaisons covalentes, généralement par des réactions de substitutions nucléophiles ou électrophiles. Les molécules de faible poids moléculaire dont on souhaite préserver la structure tridimensionnelle et les propriétés biologiques, comme des ligands de récepteurs ou transporteurs neuronaux, peuvent ainsi être marquées par des radionucléides de la famille des halogènes comme le fluor 18 (imagerie TEP), ou l'iode 123 (imagerie TEMP), du fait de leur faible encombrement stérique. Le radiomarquage à l'iode du CLINDE par substitution électrophile sera décrite dans la troisième partie du mémoire.

Les métaux de transition et de post-transition (technétium 99m, indium 111, Yttrium 90,...) se distinguent des non-métaux par le fait qu'ils nécessitent un mode de liaison plus complexe que le précédent. Au lieu d'une (voire 2) liaison(s), la stabilité du marquage n'est atteinte que par un minimum de 4 liaisons, avec une prédilection particulière pour 6 liaisons. D'autre part, la nature de la liaison est différente : au lieu d'une liaison covalente (partage de 2 électrons entre 2 atomes), ce sont des liaisons de coordination (ou liaisons datives) où un atome « donne » 2 électrons au métal déficient en électrons. C'est donc une chimie de

coordination qui aboutit à la formation de complexes volumineux. Les vecteurs fonctionnels, par exemple ceux entrant dans la composition des radiopharmaceutiques rénaux, ou myocardiques sont marqués au technétium.

Deuxième partie  
Imagerie Moléculaire de la  
Neuroinflammation

# **I. Pathologies neurologiques et variabilité de la mort neuronale**

Les pathologies neurologiques, qu'elles soient dégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson, sclérose en plaques,...) ou aiguës (accident vasculaire cérébral (AVC), traumatisme crânien) provoquent toutes la destruction et la mort de neurones. Néanmoins, les populations neuronales touchées, l'évolution de la maladie dans le temps, ainsi que les processus physiopathologiques impliqués diffèrent fortement. Par exemple, alors que la maladie d'Alzheimer affecte le tissu cortical, la maladie de Parkinson touche de façon prédominante les neurones dopaminergiques de la substance noire et ses aires de projections, la sclérose en plaques provoque des lésions dispersées le long des axones neuronaux dans tout le SNC, et l'accident vasculaire cérébral entraîne essentiellement la destruction des neurones localisés dans les territoires irrigués par l'artère cérébrale obstruée.

## **II. Physiopathologie de la neuroinflammation**

Malgré les grandes variabilités existant entre ces altérations neuronales, elles ont en commun d'être accompagnées d'un processus inflammatoire localisé aux aires cérébrales atteintes : la neuroinflammation. Le rôle délétère ou protecteur de la neuroinflammation, via la sécrétion de molécules pro- et anti-inflammatoires est encore actuellement en discussion. Une autre question majeure concernant l'étiologie de ces atteintes neurologiques est de déterminer si la neuroinflammation précède la destruction neuronale, ou si au contraire, c'est la mort des neurones qui déclenche le processus inflammatoire (Venneti et al 2006).

### **III. Cibles potentielles pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation**

L'inflammation cérébrale s'accompagne de l'altération de plusieurs paramètres physiologiques, comme 1) une variation du débit sanguin cérébral, 2) une modification du métabolisme glucidique, 3) l'induction de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS), et 4) l'activation de la microglie. L'imagerie moléculaire peut utiliser ces changements physiologiques pour visualiser de façon non-invasive la neuroinflammation, afin de mieux comprendre la physiopathologie des maladies du cerveau, d'en améliorer le diagnostic, et d'évaluer *in vivo* de nouvelles thérapies.

Bien que les modifications du débit sanguin cérébral et du métabolisme glucidique aient été exploitées avec succès pour détecter l'inflammation cérébrale par TEP ou TEMP, il s'agit de paramètres qui ne sont pas assez spécifiques du processus inflammatoire, et qui peuvent être induits par d'autres causes physiologiques. Par exemple, l'activation d'une aire cérébrale déterminée par un stimulus externe ou une tâche spécifique entraîne des variations du flux sanguin et du métabolisme du glucose dans la région concernée, visualisables par TEP (Grafton 2000). Par ailleurs, l'augmentation de la consommation de glucose par les cellules inflammatoires peut être compensée par la perte neuronale, qui mène à une diminution du métabolisme glucidique. Par conséquent, les atteintes neurodégénératives avec inflammation chronique, comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, s'accompagnent d'un hypométabolisme glucidique, dû à la destruction du tissu cérébral (Herholz 2003), alors que l'encéphalite aiguë se caractérise le plus souvent par un hypermétabolisme glucidique de certaines aires cérébrales, parfois accompagné d'hypométabolisme dans d'autres zones atrophiées du cerveau (Lee et al 2004; Scheid et al 2004).

Contrairement au débit sanguin cérébral et au métabolisme glucidique, l'induction des enzymes COX-2 et iNOS ainsi que l'activation de la microglie sont des marqueurs spécifiques de la neuroinflammation pour lesquels des outils radiopharmaceutiques sont actuellement en développement.

## **A. Cyclooxygénase 2 et imagerie moléculaire de la neuroinflammation**

### ***1. La Cyclooxygénase 2***

La cyclooxygénase est une enzyme qui intervient dans les étapes initiales de la synthèse des prostaglandines. Son sous-type 2 (COX-2) est activé lors de la réaction inflammatoire. Cette enzyme est exprimée à très faible concentration dans le cerveau sain, mais son expression augmente de façon très importante suite à un stimulus inflammatoire, en particulier dans les cellules de la microglie activée et dans les astrocytes (Tzeng et al 2005). Ainsi, des études post-mortem ont trouvé des niveaux élevés d'ARNm et de protéine COX-2 dans les aires cérébrales affectées de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, ou d'AVC (Yermakova & O'Banion 2000). La surexpression de la COX-2 dans ces pathologies s'accompagne d'une augmentation du taux de prostaglandine E<sub>2</sub> (Nogawa et al 1997; Teismann et al 2003). Cette prostaglandine est impliquée dans la neuroinflammation et intervient entre autre dans la vasodilatation, l'angiogénèse, l'induction de la fièvre, l'inhibition de l'apoptose et la sécrétion de cytokines (Tzeng et al 2005). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'activité neurotoxique de la COX-2 lors de l'inflammation cérébrale. La prostaglandine E<sub>2</sub> pourrait stimuler la production et la sécrétion de glutamate, provoquant ainsi la mort neuronale par excitotoxicité. Par ailleurs, l'activité peroxydase de la COX-2 lors de la synthèse de la prostaglandine H<sub>2</sub> à partir de

l'acide arachidonique, avec production de radicaux libres, pourrait également être en cause (Yermakova & O'Banion 2000).

## **2. Imagerie moléculaire de la COX-2**

L'imagerie *in vivo* de la COX-2 pourrait fournir de précieuses informations sur son rôle exact quand elle est surexprimée lors d'un processus inflammatoire (de Vries 2006). L'imagerie moléculaire de la COX-2 n'en est encore qu'à ses prémices, et peu de publications font état de tentatives de développement de radioligands sélectifs de la COX-2 (Figure 5).

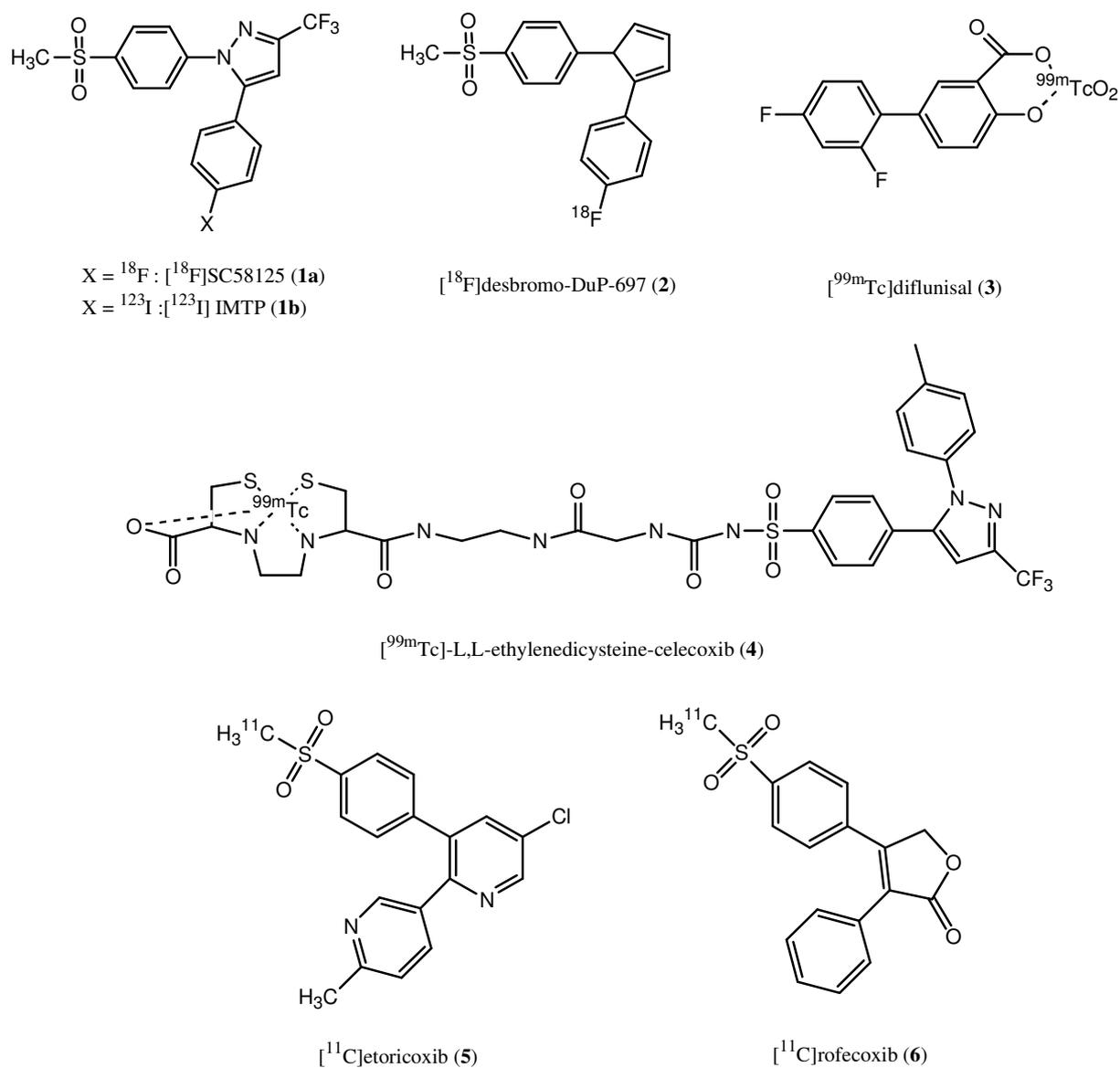
### **2.1. Le SC58125 et l'IMTP**

Le SC58125 (**1a**), un antagoniste de la COX-2, dont la structure chimique est proche de celle du celecoxib, a été marqué au fluor 18 (McCarthy et al 2002). Il a été montré que le [<sup>18</sup>F]-SC58125 s'accumule dans des macrophages surexprimant la COX-2, mais l'absence de fixation spécifique *in vivo* chez le rat et le babouin fait que le [<sup>18</sup>F]-SC58125 n'est pas utilisable en imagerie TEP. Le dérivé iodé du SC58125, l'IMTP (**1b**), a également été radiomarké (Kuge et al 2006), mais présente les mêmes inconvénients et n'est donc pas utilisable en imagerie TEMP.

### **2.2. Le desbromo-DuP-697**

Le desbromo-DuP-697 marqué au fluor 18 ([<sup>18</sup>F]-desbromo-DuP-697, (**2**) a montré une fixation spécifique dans les tissus exprimant la COX-2 chez le rat. Cependant, cette propriété n'a pu être retrouvée ni dans un modèle animal d'inflammation (de Vries et al

2003), ni dans des études préliminaires d'imagerie chez le porc. Le [ $^{18}\text{F}$ ]-desbromo-DuP-697 n'est donc pas non plus utilisable pour l'étude de la COX-2 par imagerie moléculaire.



**Figure 5. Inhibiteurs radiomarqués de la COX-2 ayant été évalués comme radioligands potentiels TEP ou TEMP.**

### ***2.3. Le Diflunisal***

Le diflunisal, un inhibiteur non-sélectif de la COX, a été complexé avec du technétium 99 métastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ), et administré sous forme de solution ophtalmique (van Sorge et al 2002). Trois pour cent de la dose administrée ont été retrouvés dans l'iris, structure de l'œil riche en enzyme COX. Les propriétés du [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-diflunisal (**3**) après administration systémique n'ont pas été étudiées.

### ***2.4. Le Celecoxib***

Le celecoxib, inhibiteur sélectif de la COX-2 a été complexé avec du technétium 99 métastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ) par l'intermédiaire de la L,L-ethylenedicysteine (EDC) (**4**) (Yang et al 2004). Ce dérivé radiomarqué du celecoxib a montré une accumulation dans les cellules exprimant fortement la COX-2, mais sa spécificité de liaison n'a jamais pu être montrée par des expériences de déplacement par un excès de celecoxib froid, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Plus récemment, les synthèses de plusieurs autres inhibiteurs sélectifs de la COX-2 radiomarqués au carbone 11, comme le [ $^{11}\text{C}$ ]-etoricoxib (**5**) et le [ $^{11}\text{C}$ ]-rofecoxib (**6**) ont été décrites (Majo et al 2005; Wust et al 2005). Néanmoins, l'évaluation de ces molécules pour l'imagerie TEP dans des modèles animaux de neuroinflammation s'est révélée décevante (de Vries et al 2008), ou n'a pas encore été publiée.

## **B. La forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) comme cible potentielle pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation**

### ***1. L'oxyde nitrique synthétase***

L'oxyde nitrique synthétase (NOS) est une enzyme qui synthétise l'oxyde nitrique, un radical libre présent dans la circulation sanguine. Elle est composée d'une chaîne polypeptidique qui possède plusieurs domaines s'enroulant autour de deux molécules d'hème. Cette chaîne polypeptidique possède deux domaines catalytiques : un domaine N-terminal oxygénase et un domaine C-terminal réductase.

Il existe dans l'organisme trois isoformes de la NOS : la forme neuronale (nNOS), la forme endothéliale (eNOS), et la forme inductible (iNOS). Ces trois isoformes sont ubiquitaires. Elles sont essentiellement exprimées dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les plaquettes, les cellules myocardiques, les macrophages, ainsi que dans les cellules des systèmes nerveux central et périphérique. Dans le cerveau, les neurones qui contiennent la NOS sont situés dans le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe et l'hypothalamus. Les nNOS et eNOS sont des protéines dont l'expression est constitutive, alors que la iNOS n'est que très faiblement exprimée à l'état physiologique, mais est induite par des cytokines dans le cytosol des macrophages lors d'une inflammation. La production d'oxyde nitrique via la forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase suite à l'activation des macrophages joue un rôle de médiateur dans la réponse immunitaire.

### ***2. Imagerie moléculaire de l'iNOS***

Comme pour la COX-2, le développement de l'imagerie moléculaire de la iNOS n'en est encore qu'à ses prémices.

Deux molécules sélectives de la forme inducible de la NOS ont été radiomarquées avec des émetteurs de positons, le S-[<sup>11</sup>C]-méthylisothiourée et le S-(2-[<sup>18</sup>F]-fluoroéthyl)-isothiourée (Zhang et al 1996). Leur évaluation chez des rats ayant reçu une injection de lipopolysaccharide (LPS), composé qui induit l'expression de la iNOS dans le foie, les poumons, le cœur et le rein, a montré une fixation significativement augmentée dans ces tissus périphériques, mais aucune étude de ces traceurs dans un modèle de neuroinflammation n'a depuis été proposée. Récemment, une nouvelle molécule fluorée a également montré sa capacité à s'accumuler spécifiquement dans les poumons de souris traitées au LPS (Zhou et al 2009).

Des radioligands marqués au carbone 11, la [<sup>11</sup>C]-S-Methyl-L-thiocitrulline ([<sup>11</sup>C]-MTICU) (Zhang et al 1997), le [<sup>11</sup>C]-AR-R17443 et le [<sup>11</sup>C]-AR-R18512 (Pomper et al 2000), spécifiques de l'isoforme neuronale de la NOS ont par ailleurs été synthétisés et évalués *in vivo* en TEP chez le primate. Alors que la [<sup>11</sup>C]-MTICU a montré une stabilité satisfaisante chez l'animal sain, elle n'a pas été évaluée dans des modèles de neuroinflammation. Le [<sup>11</sup>C]-AR-R17443 et le [<sup>11</sup>C]-AR-R18512 ont quant à eux montré une fixation spécifique de l'expression de la nNOS très insuffisante.

Des oligonucléotides ciblant l'ARN messager codant pour la synthèse protéique de l'iNOS ont également été marqués au fluor 18 (de Vries et al 2004), mais leur évaluation *in vitro* a révélé une fixation non-spécifique incompatible avec une quelconque application *in vivo*.

Pour conclure, on peut dire que l'on ne dispose pas actuellement de composé radiomarqué permettant de visualiser la COX-2 ou la iNOS par imagerie moléculaire, afin de mieux comprendre leur rôle respectif dans la neuroinflammation. Néanmoins, plusieurs

équipes poursuivent leurs travaux dans cet axe de recherche, que ce soit pour la COX-2 (de Vries et al 2008; Wuest et al 2008) ou pour la iNOS (Zhou et al 2009). La cible la plus pertinente pour l'étude de la neuroinflammation par imagerie moléculaire est à ce jour la protéine translocatrice.

## **IV. La protéine translocatrice (TSPO) comme cible potentielle pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation**

### **A. La microglie**

La microglie représente plus de 10% de la population cellulaire cérébrale totale et est constituée de cellules immunocompétentes, assimilées à des macrophages résidents du SNC. A ce titre, les cellules microgliales sont des cellules présentatrices d'antigènes étrangers, phagocytent des débris cellulaires, et participent à d'autres fonctions cérébrales (Minghetti & Levi 1998). Del Rio Hortega fut le premier à identifier le rôle physiopathologique de ces cellules dans le SNC et proposa la dénomination de « microglie » (Del Rio Hortega 1932).

Les cellules microgliales dérivent de la lignée monocyttaire et sont d'origine mésodermique (Perry & Gordon 1991). En l'absence de rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la microglie constitue la première ligne de défense du système immunitaire cérébral (Fetler & Amigorena 2005; Nimmerjahn et al 2005).

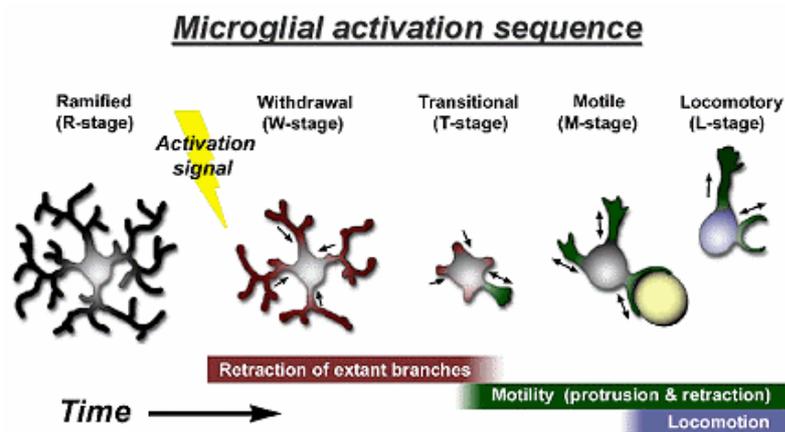
### ***1. Microglie et neurodégénérescence***

En réponse à toute agression neuronale, même de faible intensité, les cellules de la microglie vont s'activer. Par exemple, la microglie activée est retrouvée dans la maladie d'Alzheimer entourant les plaques bêta-amyloïdes (McGeer et al 1988b) ; dans la sclérose en

plaques, les régions où la démyélinisation des neurones est importante sont riches en cellules microgliales (Bauer et al 1994). L'activation de la microglie dans d'autres pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson (McGeer et al 1988a), la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Muhleisen et al 1995) ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Sargsyan et al 2005) a également été mise en évidence.

Cette activation microgliale se caractérise par un certain nombre de modifications phénotypiques :

Les cellules de la microglie vont se multiplier et subir des changements morphologiques permettant notamment leur migration par mouvement amiboïde vers la zone cérébrale atteinte (Figure 6), et la phagocytose de débris cellulaires.



**Figure 6. L'activation des cellules de la microglie se traduit par des modifications morphologiques permettant aux cellules de migrer par mouvement amiboïde vers la zone cérébrale atteinte (Stence et al 2001).**

Les cellules de la microglie sécrètent une grande diversité de molécules pro-inflammatoires et neurotoxiques qui peuvent affecter la viabilité et les fonctions neuronales. On peut par exemple citer : des radicaux libres (Chao et al 1995a), des excitotoxines (Giulian et al 1990; Piani et al 1992), les interleukine-1 (Giulian et al 1986), et 6 (Righi et al 1989), et le TNF- $\alpha$  (Chao et al 1995b). De façon contradictoire, d'autres études suggèrent un rôle

protecteur de la microglie (Masliah et al 2005). Ainsi, la participation délétère ou bénéfique des cellules microgliales dans les processus pathologiques du SNC n'est pas actuellement établie, et l'hypothèse dominante est que la microglie existerait sous différents états d'activation, en fonction de son environnement cellulaire, certains états favorisant la sécrétion de molécules neurotoxiques, et d'autres un rôle protecteur de phagocytose (Kreutzberg 1996; Morgan et al 2005).

La microglie activée exprime également des antigènes de surface spécifiques, comme la fraction C3 du complément (Graeber et al 1998), permettant leur identification immunohistochimique.

## ***2. Imagerie de la microglie activée***

La faculté des cellules de la microglie à répondre à une très grande variété de stimuli pathologiques en fait un véritable « marqueur d'événements pathologiques du SNC » (Kreutzberg 1996). Sous sa forme activée, la microglie intervient dans le processus pathologique d'une manière extrêmement localisée aux neurones endommagés. Cette propriété lui confère un grand intérêt clinique dans le repérage anatomique précis de toute atteinte neurodégénérative, aiguë ou chronique. L'imagerie de la microglie activée donne une image en positif des dommages cérébraux, complémentaire à celle pouvant être obtenue avec un radiopharmaceutique se fixant sur un récepteur ou un transporteur neuronal, dont l'intensité du signal décroît quand le nombre de neurones détruits augmente.

La détection de la microglie activée est principalement restreinte à des techniques d'anatomopathologie utilisant du tissu cérébral post mortem. Des méthodes d'imagerie *in vivo* non invasives, comme le scanner ou l'IRM, peuvent mesurer des changements de volume du cerveau (hyper- ou atrophie cérébrale), mais ne sont pas considérées comme suffisamment

sensibles pour détecter des modifications fonctionnelles comme l'activation des cellules microgliales (Jack et al 2003). L'IRM fonctionnelle utilisant des macrophages marqués avec des particules paramagnétiques d'oxyde de fer a également été proposée (Jander et al 2007; Nighoghossian et al 2007), mais il s'agit d'une technique qui reflète d'avantage les perturbations du système vasculaire que l'activation microgliale.

Les cellules de la microglie, uniquement sous leur phénotype activé, expriment intensément une protéine mitochondriale, la protéine translocatrice (TSPO), connue également sous son ancienne dénomination de PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor : Récepteur périphérique aux benzodiazépines). Cette TSPO représente donc une cible de choix pour l'imagerie moléculaire TEP ou TEMP, dans l'étude de la neuroinflammation.

## **B. La protéine translocatrice**

### ***1. Découverte de la protéine translocatrice (TSPO)***

Chez l'homme, les récepteurs aux benzodiazépines existent sous 2 formes. Les récepteurs centraux aux benzodiazépines (Central Benzodiazepine Receptor : CBR) sont localisés exclusivement dans les neurones contrôlés par l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), principal modulateur d'autres neurotransmetteurs (acétylcholine, dopamine, sérotonine), où ils participent au complexe récepteur GABA, exprimé par la quasi-totalité des neurones corticaux. Ils régulent l'activité GABAergique de ces neurones en agissant sur des canaux chlore (Chebib & Johnston 2000; Johnston et al 2006). L'effet thérapeutique des benzodiazépines, molécules fréquemment prescrites pour leurs propriétés anxiolytiques, anticonvulsives, myorelaxantes et hypnotiques, est lié à leur fixation sur les CBR dans le SNC (Costa & Guidotti 1979).

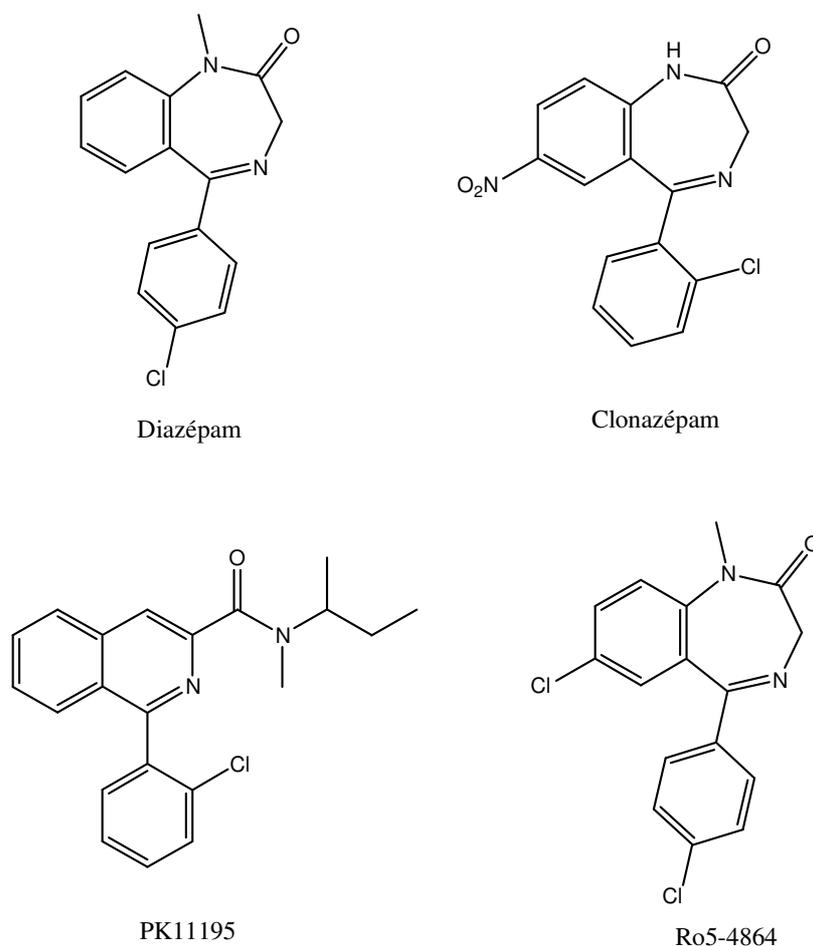
Paradoxalement, c'est l'utilisation de tissus périphériques comme témoins négatifs de liaison spécifique du diazépam (Valium<sup>®</sup>), sur des sites externes au SNC, qui a permis la découverte en 1977 d'une deuxième classe de récepteurs aux benzodiazépines, les récepteurs périphériques aux benzodiazépines, ou PBR (Braestrup & Squires 1977). D'autres dénominations ont d'ailleurs été données à ces récepteurs, telles que (1) récepteur mitochondrial aux benzodiazépines (Mitochondrial Benzodiazepine Receptor : MBR) ; (2) récepteur mitochondrial au Diazepam binding inhibitor (DBI) (Mitochondrial DBI Receptor) : MDR) ; ou (3) site de fixation périphérique aux benzodiazépines (Peripheral Benzodiazepine Binding Site : PBBS).

Plus récemment, le terme de protéine translocatrice (Translocator Protein, TSPO) a été proposé (Papadopoulos et al 2006a), en référence au rôle joué par cette protéine dans le transport du cholestérol et de la porphyrine, au niveau de la membrane mitochondriale externe.

## ***2. Caractérisation pharmacologique***

Les structures des principaux ligands des récepteurs périphériques et centraux aux benzodiazépines sont présentées dans la Figure 7. Le diazépam présente une forte affinité à la fois pour la TSPO et le CBR. D'autres benzodiazépines présentent une affinité différente pour les deux récepteurs. Ainsi, chez le rat, le dérivé 4'-chloro du diazépam, le Ro5-4864, se fixe à la TSPO avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, alors que sa liaison au CBR requiert une concentration micromolaire. Inversement, le clonazépam (Rivotril<sup>®</sup>) possède une forte affinité pour le CBR et une faible affinité pour la TSPO. Ces deux ligands ont donc été classiquement utilisés pour discriminer les deux types de récepteurs. Plusieurs années après la découverte de la TSPO a été décrite une série de composés ayant une affinité très supérieure pour la protéine

translocatrice, les carboxamides d'isoquinolines (Le Fur et al 1983). Parmi ceux-ci, le PK11195 (ou 1-(2-chlorophényl)-N-méthyl-N-(1-méthylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide), est le ligand le plus couramment utilisé (Miccoli et al 1999). Chez toutes les espèces étudiées, son affinité pour la TSPO est inférieure à 20 nM.



**Figure 7. Structure des principaux ligands des récepteurs centraux et périphériques des benzodiazépines.**

Comme nous venons de le voir, la TSPO diffère du CBR en ce qui concerne son profil pharmacologique, mais également dans sa localisation tissulaire et cellulaire. En effet, le récepteur de type central est une protéine de la membrane plasmique, que l'on retrouve exclusivement dans les neurones, alors que la TSPO est ubiquitaire dans le tissu périphérique, principalement localisée dans les mitochondries (Papadopoulos 1993).

Les propriétés permettant de distinguer les deux types de récepteurs des benzodiazépines sont résumées dans le Tableau II.

**Tableau II. Principales caractéristiques des récepteurs des benzodiazépines de type central et périphérique (Zisterer & Williams 1997).**

	<i>Type périphérique (TSPO)</i>	<i>Type central (CBR)</i>
<b>Distribution tissulaire</b>	Ubiquitaire (tissus périphériques et cellules gliales)	Neuronale
<b>Localisation cellulaire</b>	Membrane mitochondriale externe (membrane plasmique)	Membrane plasmique
<b>Ligands synthétiques</b>	PK11195, benzodiazépines (diazépam, Ro5-4864), FGIN 1-27)	Benzodiazépines (clonazépam, diazépam)
<b>Ligands endogènes</b>	DBI et porphyrines	DBI
<b>Composition moléculaire</b>	Protéine 18kDa, VDAC, ANT	Hétérogène (sous-unités $\alpha$ et $\gamma$ du récepteur au GABA)
<b>Mécanisme effecteur</b>	Transport de cholestérol/prolifération cellulaire/physiologie mitochondriale	Règle le flux de $Cl^-$ en modulant la fixation de GABA sur son récepteur

### 3. Structure de la protéine translocatrice

La TSPO est une protéine de 18 kDa constituée de 169 acides aminés organisés en 5 hélices  $\alpha$  transmembranaires dont la localisation principale est la membrane externe de la mitochondrie (Anholt et al 1986). La nature des récepteurs extra-mitochondriaux étant encore

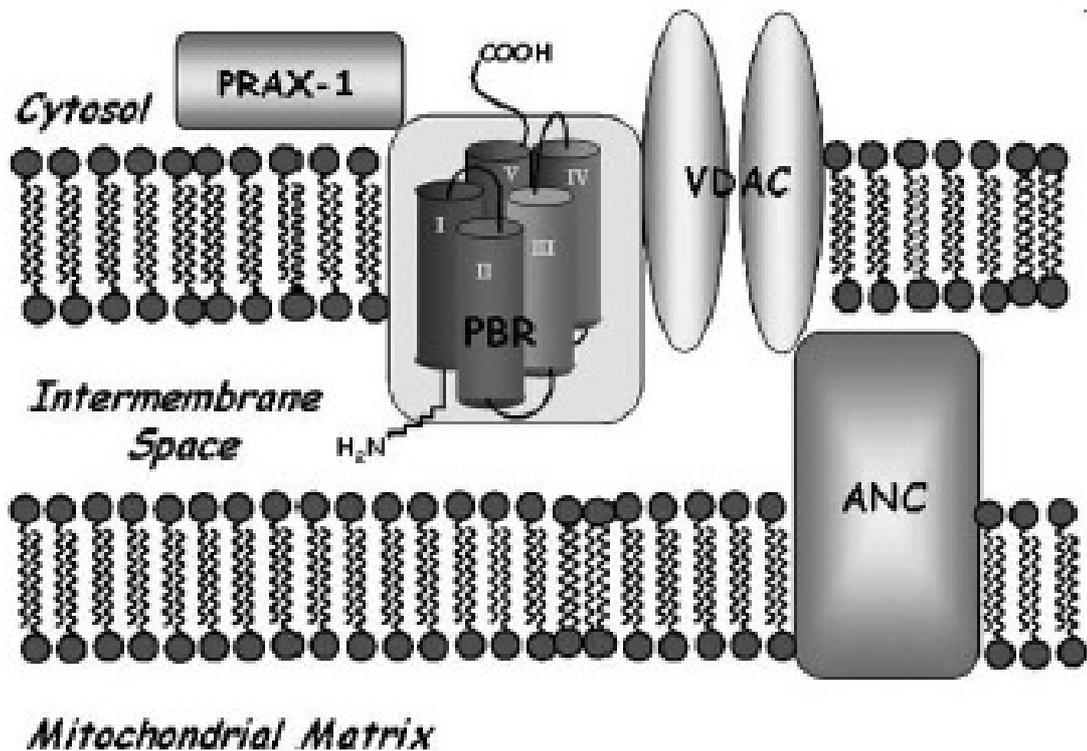
mal connue, seules les fonctions associées aux mitochondries seront développées dans ce manuscrit.

#### ***4. Distribution cellulaire***

Bien que les études de liaison de la TSPO aient révélé sa présence dans pratiquement tous les tissus, son taux d'expression varie largement. Les tissus endocrines (glandes surrénales, testicules) sont particulièrement riches en TSPO, mais sa répartition tissulaire n'est pas homogène. Ainsi, dans la glande surrénale, la TSPO est absente dans la médullosurrénale, et très abondante dans la corticosurrénale ; dans le tissu rénal, le récepteur est localisé sélectivement au niveau du tube contourné distal et de la branche ascendante de l'anse de Henlé (Drugan 1996). Ainsi, la TSPO représente un site alternatif de fixation, par lequel les benzodiazépines exerceraient des actions pharmacologiques différentes. Certains effets indésirables des benzodiazépines pourraient être dus à leur liaison à la TSPO, en raison de son abondance dans de nombreux tissus périphériques (Krueger 1995).

#### ***5. Protéines associées à la TSPO***

L'analyse de fractions mitochondriales a permis de démontrer qu'un canal anionique voltage dépendant (voltage dependent anion channel : VDAC) de 32kDa, impliqué dans le transport d'ions et de métabolites, ou porine, ainsi qu'une adénine nucléotide translocase (ANT) de 30 kDa, sont associés à la TSPO (McEnery et al 1992) (Figure 8).



**Figure 8. Complexe multimérique mitochondrial auquel appartient la TSPO (identifiée ici par son ancienne dénomination de PBR) (James et al 2006).**

L'utilisation de la méthode du double hybride a permis de décrire une nouvelle protéine, nommée PRAX-1 (pour peripheral benzodiazépine receptor associated protein 1), qui interagit avec la TSPO (Hirsch et al 1997). La présence de nombreux domaines impliqués dans les interactions protéines-protéines dans la structure de PRAX-1 suggère que celle-ci pourrait jouer le rôle d'un adaptateur permettant de recruter un large spectre de ligands. Bien que la TSPO soit principalement présente au niveau mitochondrial, PRAX-1 permet de relier la TSPO à des effecteurs cytoplasmiques ou nucléaires (Galiegue et al 1999). Ainsi, la protéine PRAX-1 ouvre un nouveau champ d'investigation sur la TSPO, qui pourrait permettre une meilleure compréhension de sa physiologie.

## **6. Les différentes fonctions de la TSPO**

De nombreux rôles ont été attribués à la TSPO (Casellas et al 2002; Papadopoulos 1993). Cette diversité de fonctions observée *in vivo* pourrait être liée à des interactions avec d'autres protéines, mitochondriales ou non.

### **6.1 Régulation de la synthèse des stéroïdes**

Compte tenu de sa localisation prédominante au niveau de la membrane externe des mitochondries, l'implication de la TSPO dans la biosynthèse des stéroïdes a été étudiée (Krueger & Papadopoulos 1992) et plusieurs publications suggèrent plus précisément un rôle dans le transport du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne des mitochondries, étape limitante dans la biosynthèse des stéroïdes (Jamin et al 2005; Krueger & Papadopoulos 1990), où le cholestérol est converti en pregnénolone par le cytochrome p450. Cette fonction de transport du cholestérol a été aussi décrite dans le foie (Lacapere & Papadopoulos 2003), organe de biosynthèse des sels biliaires ayant pour précurseur le 27-hydroxycholestérol. Le mécanisme de transport du cholestérol, qui n'est pas encore clairement élucidé, impliquerait une activation du récepteur par des ligands spécifiques comme le DBI (diazepam binding inhibitor, un ligand endogène des PBR) ou le PK11195. Cette fonction de transport a été également décrite pour d'autres molécules comme les protoporphyrines IX (Wendler et al 2003), précurseurs de plusieurs groupes prosthétiques comme les hèmes ou les hémoprotéines.

### **6.2 Physiologie mitochondriale**

La localisation de la TSPO dans la membrane externe des mitochondries a naturellement orienté les travaux sur les implications potentielles de cette protéine dans la

phosphorylation oxydative et la respiration mitochondriale (Hirsch et al 1989). L'association de la TSPO et du VDAC au sein du même complexe protéique pourrait expliquer le rôle de la TSPO sur la respiration mitochondriale, en intervenant dans le transport de métabolites vers la matrice mitochondriale.

### ***6.3 Prolifération et différenciation cellulaires, apoptose***

Dans une grande variété de lignées tumorales humaines, différents antagonistes de la TSPO, tels que le PK11195, augmentent la cytotoxicité de nombreux inducteurs apoptotiques (Jorda et al 2005), comme certains agents de chimiothérapie (doxorubicine, étoposide) (Sutter et al 2004), les radiations ionisantes (Hirsch et al 1998), ou le TNF- $\alpha$  (Bono et al 1999). Parmi les protéines décrites pour interagir avec la TSPO, le VDAC semble particulièrement important dans l'homéostasie calcique et pourrait être la clé de l'implication de la TSPO dans des processus de régulation de l'apoptose (Shoshan-Barmatz & Gincel 2003).

### ***6.4 Prolifération cellulaire et cancer***

La compréhension de la fonction de la TSPO et du mode d'action de ses ligands dans les tissus sains pourrait constituer un point de départ pour comprendre son rôle dans certains cancers comme le cancer colorectal, où la protéine translocatrice est largement surexprimée (Han et al 2003) et pourrait représenter un excellent marqueur diagnostique (Maaser et al 2002), voire une cible thérapeutique (Galiegue et al 2003). Toutefois, il n'existe pas actuellement d'explication à cette surexpression.

## **7. Expression de la TSPO dans le cerveau sain**

La TSPO a également été détectée dans le cerveau, où elle est localisée dans la glie, au niveau des astrocytes et des cellules microgliales (Lehmann et al 1999). En l'absence de pathologie inflammatoire, la TSPO est essentiellement localisée dans les cellules épendymaires qui tapissent les ventricules cérébraux, dans le bulbe olfactif et le plexus choroïde (Weissman et al 1984). On n'en sait actuellement encore peu sur ses fonctions spécifiques au niveau central. Elle semble être impliquée dans la synthèse des neurostéroïdes (Papadopoulos et al 2006b), dans la physiologie mitochondriale (Casellas et al 2002), et dans la régulation de l'activation microgliale (Veiga et al 2007). Bien que le rôle de la TSPO au sein du SNC soit encore mal connu, de nombreuses études se sont concentrées sur les variations de son expression dans les pathologies neurologiques.

## **8. Expression de la TSPO lors de la neuroinflammation : microglie versus astrocytes**

L'expression de la TSPO en réponse à une atteinte cérébrale est augmentée non seulement dans les cellules microgliales, mais également dans les astrocytes. La contribution relative de ces 2 populations cellulaires dans la surexpression de la TSPO est un sujet encore actuellement débattu ; l'expression astrocytaire de la protéine translocatrice a été montrée dans des études *in vitro* utilisant des modèles de culture cellulaire. Néanmoins, la cinétique de cette induction de la TSPO diffère fortement entre astrocytes et cellules microgliales (Chen et al 2004; Kuhlmann & Guilarte 2000). Il a par ailleurs été montré *in vivo* que la surexpression de la TSPO lors d'atteintes neurologiques était essentiellement, voire exclusivement due à la présence de cellules de la microglie activée, qu'elle caractérisait bien la transition d'une

forme quiescente à un état activé des cellules, et que la contribution astrocytaire pouvait être négligée (Banati et al 1999).

### ***9. Mécanismes potentiels de la surexpression de la TSPO au sein de la microglie activée***

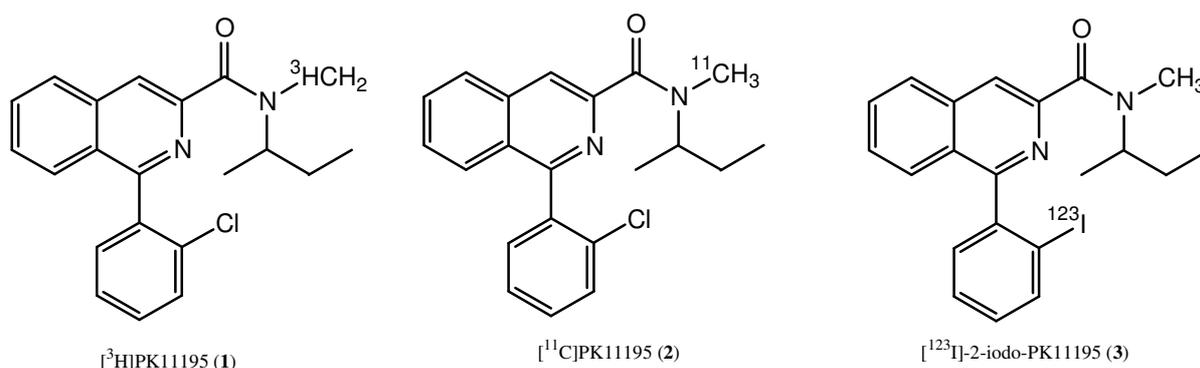
Plusieurs études ont montré que la sécrétion de cytokines lors de l'activation mitochondriale augmentait la densité de TSPO dans différentes populations cellulaires (Rey et al 2000; Trincavelli et al 2002). Néanmoins, les mécanismes biochimiques impliqués ne sont pas encore connus. Il a également été suggéré que les changements morphologiques des cellules microgliales lors de leur activation soient à l'origine de modifications structurales des mitochondries (Banati et al 2004). Ainsi, l'augmentation de la taille des cellules due à l'évolution vers une morphologie amiboïde pourrait entraîner une augmentation du nombre de mitochondries par cellule microgliale, sans que le nombre de TSPO par mitochondrie soit modifié. A l'opposé, on peut imaginer que le nombre de mitochondries ne varie pas de façon significative mais que ce soit la densité en TSPO par mitochondrie qui augmente lors de l'activation microgliale. L'hypothèse dominante actuellement est qu'à la fois le nombre de mitochondries par cellule et le nombre de TSPO par mitochondrie augmentent, mais cela doit bien entendu être confirmé expérimentalement.

### **3. Imagerie moléculaire de la TSPO avec le PK11195 : de l'autoradiographie *in vitro* à l'imagerie TEP *in vivo***

Le PK11195, ou 1-(2-chlorophenyl)-N-méthyl-N-(1-méthylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide, est un ligand spécifique de la TSPO (Le Fur et al 1983). Les radioanalogues du PK11195 (Figure 9), sous sa forme racémique ou *R*-énantiomère, plus affine (Shah et al

1994), marqués au tritium, à l'iode 123, et au carbone 11, ont été largement employés pour caractériser la TSPO et identifier sa localisation cellulaire dans le tissu cérébral par imagerie moléculaire. Ainsi, il a été montré dans de nombreux modèles animaux de neuroinflammation que l'autoradiographie *in vitro* au [<sup>3</sup>H]-PK11195 (1) permettait de visualiser la surexpression de la TSPO, corrélée à la microglie activée (Banati et al 1997; Conway et al 1998; Myers et al 1991a; Raghavendra Rao et al 2000; Stephenson et al 1995).

En imagerie moléculaire *in vivo*, le PK11195 marqué au carbone 11 (2) et son dérivé iodé (3) (Dumont et al 1999) ont été respectivement utilisés chez l'homme en TEP et en TEMP.



**Figure 9. Radioanalogues du PK11195 marqués au tritium (1), au carbone 11 (2) et à l'iode 123 (3).**

### 1. Etudes cliniques réalisées en neurologie avec le [<sup>11</sup>C]-PK11195

Le [<sup>11</sup>C]-PK11195 a été utilisé chez l'homme pour explorer la neuroinflammation dans diverses pathologies du SNC par imagerie moléculaire TEP. Il est surprenant de noter qu'aucune étude évaluant la dosimétrie de ce traceur pourtant largement employé en pathologie humaine n'avait été publiée jusqu'à il y a seulement quelques semaines (Hirvonen et al 2009). Cette dernière a conclu que l'imagerie TEP au [<sup>11</sup>C]-PK11195 était associée à une exposition très modérée aux rayonnements ionisants, compatible avec la réalisation d'un suivi

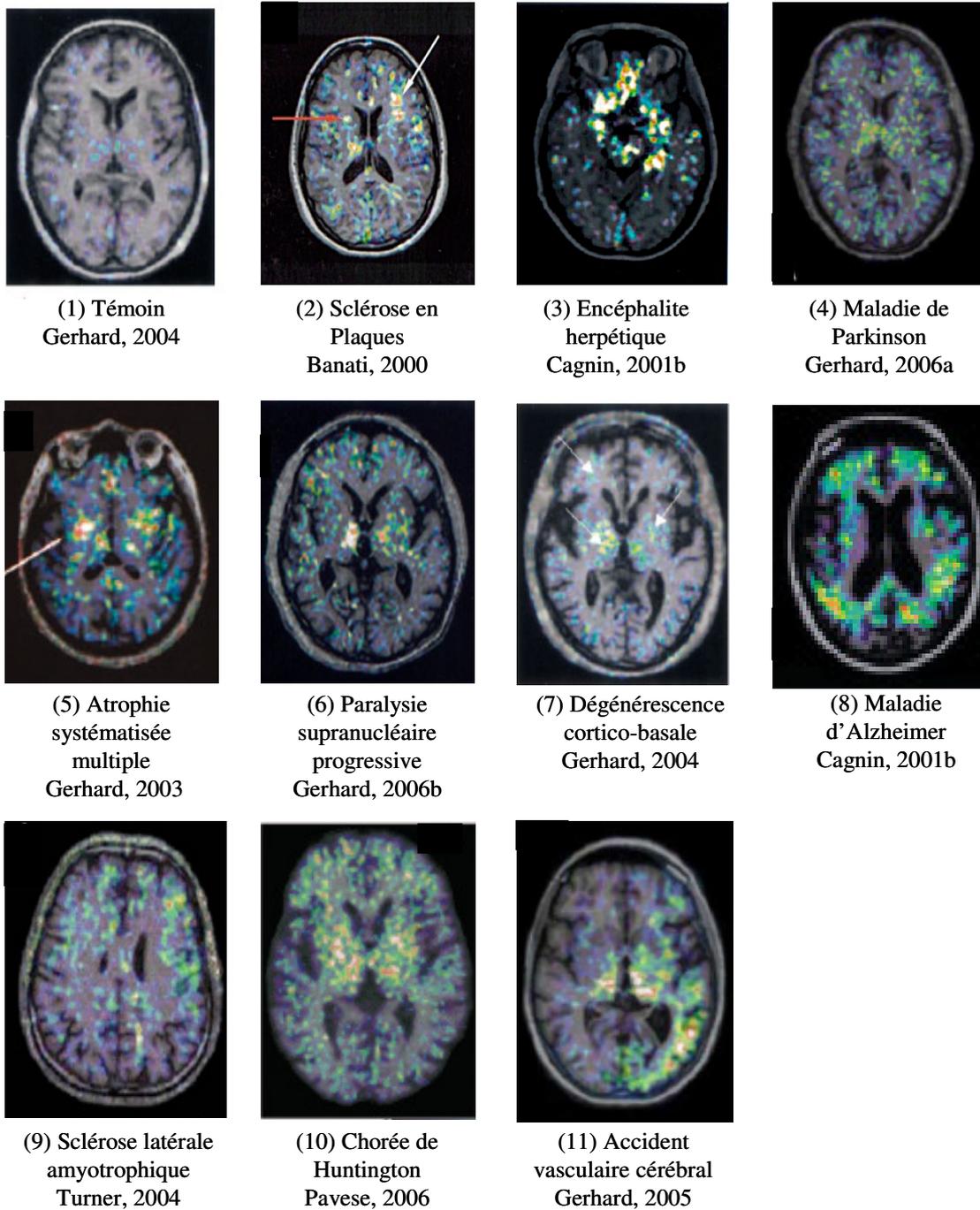
longitudinal chez un même patient. La Figure 10 présente des images scintigraphiques extraites de ces études cliniques réalisées avec le [<sup>11</sup>C]-PK11195.

Lors de ces travaux, et plus généralement en imagerie moléculaire, le radiopharmaceutique est utilisé à concentration très faible, dite dose traceuse ou microdose, définie en Europe et aux Etats-Unis comme moins de un centième de la dose de substance froide nécessaire pour observer un effet pharmacologique, avec une dose maximale inférieure à 100 microgrammes (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) ; Food and Drug Administration (FDA), 2005). Dans ces conditions, le radioligand n'altère donc pas la fonctionnalité du récepteur ciblé, et n'a aucun effet pharmacologique.

### ***1.1 Imagerie moléculaire de la neuroinflammation utilisant le [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans les pathologies du SNC inflammatoires***

#### **a. La Sclérose en Plaques (Banati et al 2000; Debruyne et al 2002; Vas et al 2008; Versijpt et al 2005; Vowinckel et al 1997)**

La sclérose en plaques est une maladie démyélinisante du SNC qui touche donc essentiellement la substance blanche. Dans la sclérose en plaques, les études TEP avec quantification ont démontré une surexpression de la TSPO au sein de la microglie activée dans les tissus pathologiques identifiés par IRM (Figure 10, (2)). Une augmentation de la fixation du [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans des structures d'apparence normale à l'IRM (thalamus) a également été décrite (Banati et al 2000; Debruyne et al 2003), suggérant que la maladie progresse au-delà des lésions pouvant être visualisées par l'IRM.



**Figure 10.** Images scintigraphiques extraites des études cliniques réalisées avec le  $[^{11}\text{C}]$ -PK11195. Sa distribution *in vivo* correspond aux aires cérébrales atteintes spécifiquement dans chacune de ces pathologies. Ces images sont présentées à titre d'illustration, mais ne sont pas comparables entre elles car les doses de  $[^{11}\text{C}]$ -PK11195 administrées, les caméras TEP utilisées, les temps d'acquisition et les outils de reconstruction de l'image diffèrent d'une étude à l'autre.

**b. L'encéphalite virale (encéphalite herpétique (Cagnin et al 2001b) et encéphalite de Rasmussen (Banati et al 1999))**

Chez 2 patients atteints d'encéphalite herpétique, la distribution cérébrale du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 correspond bien à la détérioration cognitive observée (Figure 10, (3)). Un deuxième PETscan réalisé 6 mois plus tard a montré une hyperfixation du radiopharmaceutique dans des aires cérébrales qui n'étaient pas touchées lors de la première scintigraphie, ce qui suggère une progression du processus inflammatoire (Cagnin et al 2001b).

L'encéphalite de Rasmussen se caractérise par une inflammation corticale progressive d'un seul hémisphère cérébral (Rasmussen & Andermann 1991). Chez les patients étudiés, le potentiel de liaison (Binding potential : BP) du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195, défini comme le rapport de la densité de récepteur dans la région étudiée par l'affinité du radioligand pour sa cible moléculaire, était environ 10 fois supérieur dans l'hémisphère infecté (Banati et al 1999).

Récemment, une observation clinique utilisant le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 pour repérer la neuroinflammation associée à un foyer épiléptogène chez un enfant de 5 ans atteint d'encéphalite d'étiologie inconnue a été rapporté (Kumar et al 2008). L'enfant a pu être opéré avec succès.

## ***1.2 Imagerie moléculaire de la neuroinflammation utilisant le [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans les pathologies neurodégénératives***

### **a. Les pathologies extra-pyramidales**

#### *a.1 La maladie de Parkinson (Gerhard et al 2006a; Ouchi et al 2005)*

La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire. L'activation de la microglie a pu être caractérisée *in vivo* à l'aide du [<sup>11</sup>C]-PK11195 (Figure 10, (4)). Ouchi et al ont étudié une population de patients atteints d'une maladie de Parkinson débutante, avant l'initiation du traitement, chez laquelle ils ont trouvé une corrélation positive entre la fixation du radiopharmaceutique et la sévérité de l'atteinte motrice. Au contraire, Gerhard et al se sont intéressés à une population de parkinsoniens à un stade plus évolué, chez qui ils ont montré que l'intensité de l'activation microgliale n'était pas fonction de la sévérité de la maladie. Ces 2 résultats a priori contradictoires semblent plutôt refléter l'évolution de la neuroinflammation au cours de la maladie, avec un pic correspondant à un stade débutant voire préclinique, puis un plateau correspondant à une activation microgliale chronique.

#### *a.2 Autres pathologies d'origine extrapyramidale (Gerhard et al 2003; Gerhard et al 2006b; Gerhard et al 2004; Henkel et al 2004)*

La neuroinflammation a également été étudiée en TEP avec le [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans d'autres syndromes extra-pyramidaux à la symptomatologie proche de la maladie de Parkinson, comme l'atrophie systématisée multiple (Figure 10, (5)) (Gerhard et al 2003), la paralysie supranucléaire progressive (ou maladie de Steele-Richardson) (Figure 10, (6)) (Gerhard et al 2006b) ou la dégénérescence cortico-basale (démence dégénérative associée à

un syndrome extrapyramidal) (Figure 10, (7)) (Gerhard et al 2004; Henkel et al 2004). Il a été montré *in vivo* que la distribution du [<sup>11</sup>C]-PK11195 correspondait aux aires cérébrales atteintes spécifiquement dans chacune de ces pathologies (noyaux caudés, putamen et substance noire dans la dégénérescence cortico-basale, cortex pré-frontal dorsolatéral, putamen et substance noire dans l'atrophie multisystématisée et région corticale et sous-corticale dans la paralysie supranucléaire).

## **b. Démences**

*b.1 Maladie d'Alzheimer (Cagnin et al 2001a; Edison et al 2008; Okello et al 2009; Tomasi et al 2008; Wiley et al 2009)*

Dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, les cellules de la microglie activée sont recrutées sur les sites présentant des plaques séniles associées à un dépôt de peptide amyloïde (Eikelenboom et al 2008), et sont ainsi un marqueur de l'intensité de la maladie. Cagnin et al ont montré qu'il était possible de détecter et de quantifier *in vivo* par TEP cette activation microgliale dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Figure 10, (8)) en mettant en évidence une augmentation du BP du [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans les aires cérébrales où se concentrent les plaques (cortex temporal inférieur et médian, amygdale, lobe pariétal, et cortex cingulaire postérieur). L'activation de la microglie dans la maladie d'Alzheimer a également été détectée par le [<sup>123</sup>I]-iodo-PK11195 en imagerie moléculaire TEMP (Versijpt et al 2003). La fixation du dérivé iodé du PK11195 était significativement augmentée dans le cortex frontal et temporal, et inversement corrélée aux résultats des patients à des tests cognitifs. Trois études associant le [<sup>11</sup>C]-PK11195 au [<sup>11</sup>C]-PIB, un radiopharmaceutique ciblant les plaques amyloïdes, ont récemment été publiées. L'une d'entre elles a retrouvé cette corrélation négative entre le degré de fixation du [<sup>11</sup>C]-

PK11195 et les résultats de tests cognitifs (Edison et al 2008). Les 2 autres ont été menées à la fois chez des patients présentant une maladie d'Alzheimer déclarée et chez des patients atteints de déclin cognitif modéré (MCI : Mild Cognitive Impairment). L'une a conclu que, contrairement au [<sup>11</sup>C]-PIB, la fixation du [<sup>11</sup>C]-PK11195 n'était significativement augmentée que chez les patients étant à un stade avancé de la maladie (Wiley et al 2009) L'autre étude a mis en évidence une importante variabilité interindividuelle dans l'intensité de la fixation des 2 radiopharmaceutiques, certains patients présentant une fixation importante du [<sup>11</sup>C]-PK11195 associée à une détection faible du [<sup>11</sup>C]-PIB, et d'autres patients la situation inverse, pour des résultats aux tests cognitifs équivalents (Okello et al 2009).

### *b.2 Démence fronto-temporale (Cagnin et al 2004)*

Le [<sup>11</sup>C]-PK11195 a également été utilisé pour caractériser l'activation microgliale dans d'autres types de démence, comme la démence fronto-temporale, dont l'âge moyen de survenue se situe entre 50 et 60 ans. La Maladie de Pick est la forme de démence fronto-temporale la plus fréquente. Le profil de distribution du [<sup>11</sup>C]-PK11195 diffère de celui observé dans la maladie d'Alzheimer, montrant une intense fixation dans le cortex fronto-temporal.

### **c. La sclérose latérale amyotrophique (Turner et al 2004)**

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une pathologie neurologique évolutive qui provoque la destruction des motoneurones. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone de l'adulte. Le [<sup>11</sup>C]-PK11195 a démontré la présence de microglie activée dans le cortex moteur de patients SLA, avec une forte corrélation entre son BP et le stade clinique de la maladie (Figure 10, (9)).

#### **d. La chorée de Huntington (Pavese et al 2006; Politis et al 2008)**

La chorée de Huntington est une maladie chronique héréditaire à transmission autosomique dominante touchant l'adulte entre 30 et 50 ans et associant des mouvements choréiques (mouvements uni- ou bilatéraux anormaux involontaires spontanés, brusques et brefs, irréguliers et de grande amplitude) et des troubles psychiques (détérioration intellectuelle pouvant évoluer en démence). L'augmentation de la fixation du [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans le striatum, le cortex (Pavese et al 2006) et l'hypothalamus (Politis et al 2008) de patients atteints de cette maladie (Figure 10, (10)) par rapport à des témoins (Figure 10, (1)) a été caractérisée et corrélée à la sévérité clinique de la maladie ainsi qu'à la perte de neurones dopaminergiques D2 dans le striatum, évaluée à l'aide du [<sup>11</sup>C]-raclopride, un antagoniste radiomarqué de la dopamine.

#### **d. La schizophrénie (van Berckel et al 2008)**

Les recherches portant sur l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation ont récemment été étendues aux pathologies neuropsychiatriques, et en particulier à la schizophrénie. Le BP du [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans la matière grise de patients schizophrènes est significativement augmenté par rapport à celui mesuré dans une population témoin, suggérant ainsi que l'activation microgliale prend part au processus physiopathologique de la schizophrénie.

*1.3 Imagerie moléculaire de la neuroinflammation utilisant le [<sup>11</sup>C]-PK11195 dans l'accident vasculaire cérébral (Gerhard et al 2000; Gerhard et al 2005; Pappata et al 2000; Price et al 2006; Ramsay et al 1992)*

L'AVC est la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité en France après le cancer et les accidents coronariens, et est à l'origine de graves séquelles dans 40% des cas (1<sup>ère</sup> cause d'infirmité sévère définitive). L'AVC est avec la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer la pathologie neurologique dans laquelle le rôle de la neuroinflammation a été le plus étudié (5 publications internationales, 23 patients inclus), les examens TEP au [<sup>11</sup>C]-PK11195 ayant été réalisés de 2 jours jusqu'à 24 mois post-AVC. L'activation de la microglie est détectable dès 3 jours post-AVC, dans le territoire ischémique (cortex le plus souvent) et en périphérie (appelée pénombre) (Figure 10, (11)). Une étude longitudinale chez le même patient a montré que le signal mesuré évolue au cours du temps ; la neuroinflammation est donc un phénomène dynamique. Enfin, des examens réalisés à distance de la phase aiguë (6 à 24 mois post-AVC) ont révélé une activation microgliale chronique dans les noyaux thalamiques, à distance de la région ischémique, correspondant aux projections des fibres neuronales cortico-thalamiques. Ce phénomène inflammatoire persistant semble influencer sur la sévérité des séquelles sensitivo-motrices pour le patient et représente une cible thérapeutique potentielle (Freret et al 2006). Nous reviendrons sur ce dernier point dans la troisième partie expérimentale de ce travail.

Ainsi, on peut conclure de l'ensemble de ces études que l'imagerie moléculaire TEP ou TEMP utilisant les analogues du PK11195 comme radiopharmaceutiques permet de détecter la neuroinflammation dans des atteintes neurologiques variées, résumées dans le Tableau III, et cela à un stade précoce de la maladie. L'imagerie de la microglie activée

présente donc un intérêt certain d'une part dans l'évaluation clinique de nouveaux traitements, et d'autre part comme marqueur précoce de la progression de la maladie.

**Tableau III. Le [<sup>11</sup>C]-PK11195 a été utilisé en recherche clinique dans une grande variété d'atteintes neurologiques pour détecter la neuroinflammation par imagerie moléculaire. Sa distribution *in vivo* correspond aux aires cérébrales atteintes spécifiquement dans chacune de ces pathologies.**

<i>Pathologie</i>	<i>Nombre d'études</i>	<i>Nombre total de patients étudiés</i>	<i>Références bibliographiques</i>
<b>Première étude utilisant le [<sup>11</sup>C]-PK11195 <i>in vivo</i> chez l'Homme</b>		(Charbonneau et al 1986)	
<b>Sclérose en Plaques</b>	5	38	(Banati et al 2000) (Debruyne et al 2002) (Vas et al 2008) (Vowinckel et al 1997) (Versijpt et al 2005)
<b>Encéphalites virales</b>	3	5	(Cagnin et al 2001b) (Banati et al 1999) (Kumar et al 2008)
<b>Maladie de Parkinson</b>	2	28	(Gerhard et al 2006a) (Ouchi et al 2005)
<b>Atrophie multisystématisée</b>	1	5	(Gerhard et al 2003)
<b>Paralyse supranucléaire</b>	1	4	(Gerhard et al 2006b)
<b>Dégénérescence cortico-basale</b>	2	5	(Henkel et al 2004) (Gerhard et al 2004)
<b>Maladie d'Alzheimer</b>	5	37 20 MCI	(Cagnin et al 2001a) (Tomasi et al 2008) (Edison et al 2008) (Wiley et al 2009) (Okello et al 2009)

<b>Démence fronto-temporale</b>	1	5	(Cagnin et al 2004)
<b>Sclérose latérale amyotrophique</b>	1	10	(Turner et al 2004)
<b>Schizophrénie</b>	1	10	(van Berckel et al 2008)
<b>Chorée de Huntington</b>	2	20	(Pavese et al 2006) (Politis et al 2008)
<b>Accident vasculaire cérébral</b>	5	23	(Ramsay et al 1992) (Pappata et al 2000) (Gerhard et al 2000) (Gerhard et al 2005) (Price et al 2006)

## 2. *Limites à l'utilisation du [<sup>11</sup>C]-PK11195 en clinique*

Bien que le [<sup>11</sup>C]-PK11195 ait été utilisé avec succès pour visualiser la neuroinflammation dans diverses pathologies cérébrales, il présente plusieurs inconvénients qui limitent son utilisation potentielle en routine clinique dans les services de médecine nucléaire. Une étape clé dans l'évaluation d'un nouveau radiotraceur pour l'imagerie *in vivo* d'une cible protéique cérébrale comme la TSPO est la détermination de la proportion du signal mesuré qui est due à la fixation spécifique du radioligand étudié sur sa cible, par rapport à sa fixation non spécifique. En raison de son caractère lipophile (c logP = 5,3) (Lockhart et al 2003), le rapport « signal spécifique de la TSPO / signal non spécifique » du [<sup>11</sup>C]-PK11195 est faible (Kropholler et al 2005; Shah et al 1994). Par ailleurs, il subit un métabolisme aboutissant à la formation de dérivés radiomarqués suffisamment lipophiles pour

passer la BHE et ainsi perturber le signal mesuré (De Vos et al 1999; Greuter et al 2005; Pike et al 1993). Il a aussi été montré chez l'homme que la captation cérébrale du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 était relativement faible (Debruyne et al 2002), en raison d'une fixation aux protéines plasmatiques élevée et très variable d'un individu à l'autre (Lockhart et al 2003). Tous ces paramètres rendent difficiles une quantification précise des variations de densité en TSPO chez l'homme à l'aide du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195.

Pour tenter de surmonter ces contraintes, des outils mathématiques adaptés basés sur l'application d'algorithmes sophistiqués ont permis d'améliorer la spécificité du signal mesuré afin d'obtenir une quantification plus fine lors d'études cliniques TEP réalisées avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 (Anderson et al 2007; Kropholler et al 2006; Tomasi et al 2009; Tomasi et al 2008; Turkheimer et al 2007; Yaqub et al 2008).

Un autre inconvénient majeur du PK11195 quand on envisage son utilisation en routine clinique vient du fait que l'on ne dispose pas à l'heure actuelle d'un analogue radiomarké au fluor 18. En effet, la demi-vie du fluor 18 est de 110 minutes, contre seulement 20 minutes pour le carbone 11, ce qui permet son acheminement dans les radiopharmacies à partir de son site de production (cyclotron). Les études utilisant le carbone 11 impliquent au contraire que le cyclotron soit installé sur le même site que le service de médecine nucléaire, ce qui est réalisable pour quelques centres TEP dédiés à la recherche clinique, mais devient inenvisageable à l'échelle de la pratique hospitalière courante. Par ailleurs, le fluor 18, toujours grâce à sa demi-vie plus longue, permet d'augmenter le temps d'acquisition des images sous la caméra, et ainsi de mesurer plus précisément certains paramètres pharmacodynamiques comme la clairance effective du radiopharmaceutique, ou encore sa fixation non-spécifique. On obtient ainsi une quantification plus fine de la fixation spécifique du radioligand sur la TSPO.

Récemment, la synthèse radiochimique d'un dérivé fluoropropyl du PK11195 a été décrite (Yu et al 2008). Ce composé fluoré possède une bonne affinité *in vitro* pour la TSPO ( $K_i = 0,26$  nM, sur préparation membranaire mitochondriale de rein de rat, en compétition avec le [ $^3$ H]-PK11195), et son évaluation pré-clinique *in vivo* chez le singe est en cours.

#### **4. Nouveaux radioligands pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation utilisant la TSPO comme cible moléculaire.**

Les premières études TEP menées chez l'homme datent de 1986, et ont été réalisées avec le [ $^{11}$ C]-PK11195 (Charbonneau et al 1986) et le [ $^{11}$ C]-Ro5-4864 (Bergstrom et al 1986). Alors que pendant plus de 15 ans, aucun autre ligand radiomarqué spécifique de la TSPO n'a été injecté à l'homme, hormis le dérivé iodé du PK11195, la dernière décennie a vu une véritable explosion de nouvelles molécules utilisables en imagerie moléculaire TEMP ou TEP (Figure 11).

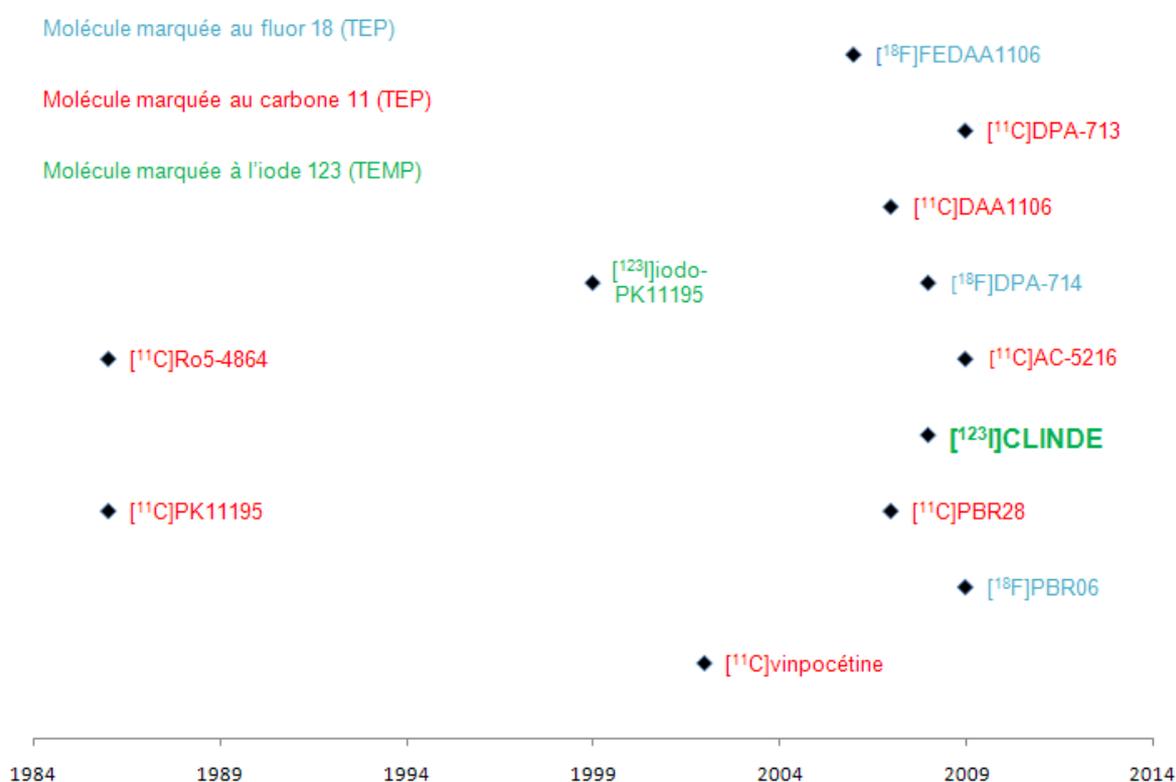
Les revues de la littérature récemment publiées sur le sujet se sont proposé de référencer ces nombreux nouveaux radioligands de la TSPO, en s'intéressant plus particulièrement aux interactions spécifiques ligand-récepteur (James et al 2006), à l'expérimentation préclinique et aux modèles animaux de neuroinflammation utilisés (Chauveau et al 2008), ou encore à la radiochimie (Dolle et al 2009).

Il ressort de ces travaux que 7 grandes classes chimiques de composés radiomarqués ayant une forte affinité pour la TSPO peuvent à l'heure actuelle être distinguées :

- les benzodiazépines
- les dérivés quinoline carboxamide
- les vinca alcaloïdes
- les oxodihydropurines

- les dérivés phénoxyaryl-acétamide
- les dérivés pyrazolo[1,5-a]pyrimidine
- les dérivés imidazo-[1,2-a]pyridine

Ces 2 dernières séries de composés ont été synthétisées par 2 équipes australiennes avec lesquelles le CHU et l'Université de Tours ont établi des collaborations scientifiques via l'UMR Inserm U930, qui participe activement à la validation clinique et préclinique de ces molécules.



**Figure 11.** La dernière décennie a vu une véritable explosion de nouvelles molécules spécifiques de la TSPO utilisables en imagerie moléculaire TEMP ou TEP (en abscisse est indiquée l'année de la publication scientifique rapportant la première injection à l'homme du radiopharmaceutique).

Ces classes de radioligands de la TSPO sont présentées dans les pages suivantes, sans recherche d'exhaustivité, mais en détaillant les travaux réalisés avec les principaux « chefs de file » de chaque série, et en insistant sur les composés les plus prometteurs. Le Tableau IV résume cet état de l'art de la littérature.

**Tableau IV. Résumé des principaux radioligands de la TSPO : études précliniques ex vivo et in vivo, modèles de neuroinflammation et études cliniques (adapté et actualisé à partir de Chauveau et al 2008).**

Classe chimique	Nom du radioligand	Radionucléide	Structure / Radiosynthèse	Biodistribution, autoradiographie ex vivo (rat)	Imagerie in vivo	Modèle de neuroinflammation	Etude clinique chez l'homme sain	Pathologie humaine
<b>Benzodiazépine</b>	Ro5-4864	Carbone 11	(Turton et al 1984)		(Weissman & Raveh 2003) (revue)		(Bergstrom et al 1986)	
<b>Quinoline_ carboxamide</b>	PK11195	Carbone 11	(Camsonne et al 1984; Shah et al 1993)		(Cagnin et al 2002; Venneti et al 2006) (revues)		(Charbonneau et al 1986)	(Cagnin et al 2002; Venneti et al 2006) (revues)
	iodo-PK11195	Iode 123	(Gildersleeve et al 1996; Pimlott et al 2008)	(Dumont et al 1999) (souris) (Gildersleeve et al 1996)	Chien : (Gildersleeve et al 1996)		(Dumont et al 1999)	
	VC195	Carbone 11	(Matarrese et al 2001)	(Matarrese et al 2001)		Rat : AQ (Belloli et al 2004)		
<b>Vinca alcaloïde</b>	Vinpocétine	Carbone 11	(Gulyas et al 1999)		Primate : (Gulyas et al 1999; Gulyas et al 2005; Gulyas et al 2002b)		(Gulyas et al 2002a)	SEP : (Vas et al 2008), comparaison avec [ <sup>11</sup> C]-PK11195
<b>Oxodihydropurine</b>	AC-5216	Carbone 11	(Amitani et al 2006)	(Amitani et al 2006; Yanamoto et al 2007; Zhang et al 2007b)	Primate : (Zhang et al 2007b)	Rat : AK (Yanamoto et al 2007)	(Miyoshi et al 2009)	
	DAC	Carbone 11	(Yanamoto et al 2009)	(Yanamoto et al 2009) (souris)	Rat : (Yanamoto et al 2009) Souris : (Yamasaki et al 2009)	Rat : AK (Yanamoto et al 2009) Souris : tumeur (Yamasaki et al 2009)		
<b>Phénoxyaryl-acétamide</b>	DAA1106	Carbone 11	(Zhang et al 2003a)	(Zhang et al 2003a) (souris) (Maeda et al 2004)	Primate : (Maeda et al 2004) Lapin : (Probst et al 2007) Rat : (Venneti et al 2007a; Venneti et al 2007b)	Rat : AK (Maeda et al 2004), traumatisme crânien (Venneti et al 2007b), LPS, 6-OHDA (Venneti et al 2007a)	(Ikoma et al 2007)	MA : (Yasuno et al 2008)
	FEDAA1106	Fluor 18	(Zhang et al 2003b)	(Zhang et al 2003b)	Primate : (Zhang et al 2004b) Rat : (Maeda et al 2007a)	MA (souris transgénique) (Maeda et al 2007b) Rat : éthanol	(Fujimura et al 2006; Shidahara et al 2008)	
	PBR28	Carbone 11	(Briard et al 2005; Briard et al 2008; Wang et al 2009b)		Primate : (Briard et al 2005; Briard et al 2008; Brown et al 2007; Imaizumi et al 2008) Rat : (Imaizumi et al 2007b)	Rat : ischémie (Imaizumi et al 2007b)	(Brown et al 2007; Fujita et al 2008)	

Classe chimique	Nom du radioligand	Radionucléide	Structure / Radiosynthèse	Biodistribution, autoradiographie <i>ex vivo</i> (rat)	Imagerie <i>in vivo</i>	Modèle de neuroinflammation	Etude clinique chez l'homme sain	Pathologie humaine
	PBR06	Fluor 18	(Imaizumi et al 2007a)		Primate : (Imaizumi et al 2007a)		(Fujimura et al 2009)	
	FEPPA	Carbone 11	(Wilson et al 2008)	(Wilson et al 2008)				
<b>Imidazo-[1,2a]-pyridine</b>	CLINDE	Iode 123	(Katsifis et al 2000a)	(Arlicot et al 2008; Mattner et al 2005; Mattner et al 2008)		Rat : AQ (Arlicot et al 2008), EAE (Mattner et al 2005)	(Tamagnan 2008)	
	IZOL	Iode 123	(Katsifis et al 2000b)	(Mattner et al 2006)				
	CLINME	Carbone 11	(Thominiaux et al 2007)		Rat : (Boutin et al 2007b)	Rat : AMPA (Boutin et al 2007b)		
	PBR111	Fluor 18	(Fookes et al 2008)	(Fookes et al 2008)	(van Camp et al 2008)	Rat : AMPA (van Camp et al 2008)		
<b>Pyrazolo-[1,5-a]-pyridine</b>	DPA-713	Carbone 11	(James et al 2005; Thominaux et al 2006)		Primate : (James et al 2005) Rat : (Boutin et al 2007a; Chauveau et al 2009; Doorduyn et al 2009)	Rat : AMPA (Boutin et al 2007a; Chauveau et al 2009), encéphalite herpétique (Doorduyn et al 2009)	(Endres et al 2009)	
	DPA-714	Fluor 18	(James et al 2008)	(James et al 2008)	Primate : (James et al 2008) Rat : (Chauveau et al 2009; Doorduyn et al 2009; Martin et al 2009)	Rat : AQ (James et al 2008), AMPA (Chauveau et al 2009), encéphalite herpétique (Doorduyn et al 2009), ischémie (Martin et al 2009)		SLA : (Le Pogam et al 2008)

## ***1. Les benzodiazépines***

Historiquement, la radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]-Ro5-4864 (Turton et al 1984) a été publiée la même année que celle du [<sup>11</sup>C]-PK11195, mais les premières expérimentations chez l'homme se révélèrent décevantes (Bergstrom et al 1986; Junck et al 1989) du fait d'une très importante fixation non spécifique du traceur, mettant en évidence une variabilité inter-espèce importante pour ce composé (Farges et al 1994).

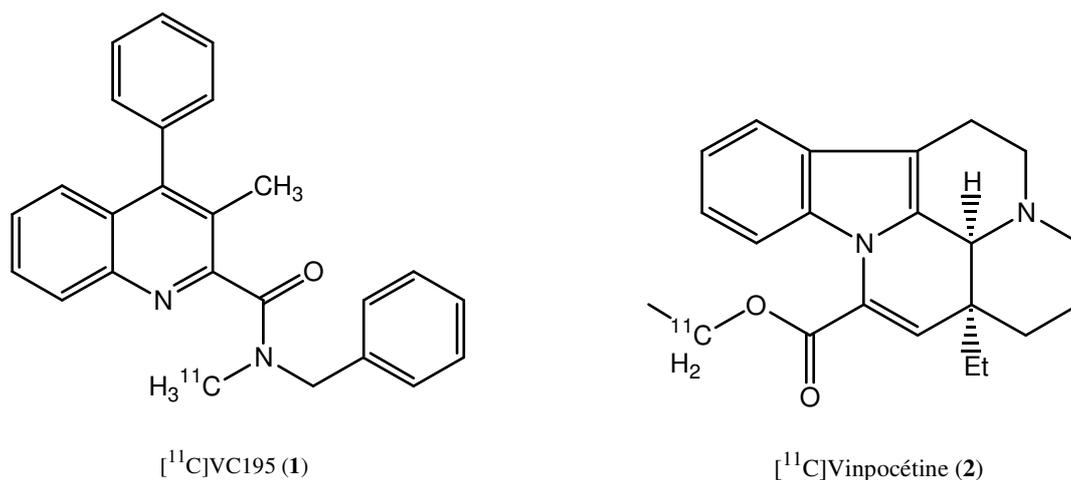
## ***2. Les dérivés quinoline carboxamide***

### ***2.1 Le PK11195***

Le PK11195 est un dérivé 3-isoquinoline carboxamide, et appartient donc à cette seconde série. Le *R*-énantiomère du PK11195 a montré une meilleure affinité pour la TSPO (Shah et al 1994), et a donc été utilisé pour la plupart des études TEP menées avec le [<sup>11</sup>C]-PK11195.

### ***2.2 Le VC195***

Belloli et al ont synthétisé une série de composés radiomarqués au carbone 11 de structure quinoline-carboxamide (Belloli et al 2004). Parmi eux, le [<sup>11</sup>C]-VC195 (Figure 12 (**1**)) est le seul à avoir montré une fixation cérébrale spécifique de la TSPO. Néanmoins, le signal mesuré est faible car le [<sup>11</sup>C]-VC195 ne passe pas bien la BHE. D'autres composés radiomarqués au carbone 11 appartenant à cette même série ont depuis été décrits (Cappelli et al 2006), mais ils n'apportent pas d'avancée par rapport au [<sup>11</sup>C]-PK11195.

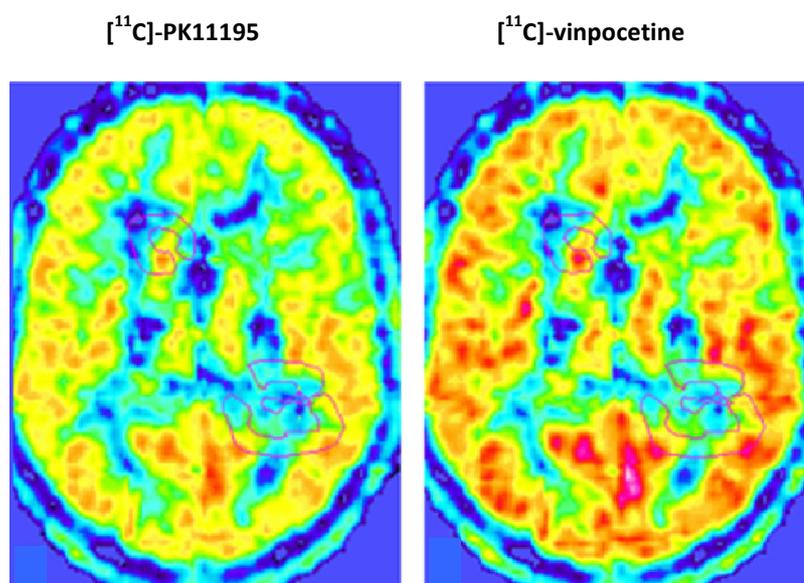


**Figure 12. Structure chimique du [11C]-VC195 et de la [11C]-Vinpocétine.**

### 3. Les vinca alcaloïdes

La vinpocétine, représentant principal de cette classe chimique, (Figure 12(2)) est un dérivé semi-synthétique de l'alcaloïde naturel vincamine extrait de la petite pervenche (*Vinca minor*), utilisé comme neuroprotecteur dans le traitement et la prévention des maladies vasculaires cérébrales, comme l'AVC ischémique, et ce, bien que son mécanisme d'action soit à ce jour encore inconnu (Lorincz et al 1976). La vinpocétine a été marquée au carbone 11 au Karolinska Institute de Stockholm pour étudier ses paramètres pharmacodynamiques chez l'homme par TEP (Gulyas et al 2002a; Gulyas et al 2002b). Après administration orale, il est apparu que la [11C]-vinpocétine avait une distribution cérébrale préférentielle pour les structures riches en TSPO (ventricules, canal épendymaire), et des études complémentaires *in vitro* ont montré qu'elle avait une forte affinité pour la TSPO. Après validation chez le primate (Gulyas et al 2005), la [11C]-vinpocétine a été évaluée chez des patients atteints de sclérose en plaques, en comparaison appariée avec le [11C]-PK11195 (chaque patient a eu un examen TEP avec chacun des 2 radiopharmaceutiques) (Vas et al 2008). Comme le suggère la Figure 13, le Binding Potential de la [11C]-vinpocétine est significativement plus élevé que

celui du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195, traduisant une bonne affinité *in vivo* pour la TSPO et une forte captation cérébrale de la [ $^{11}\text{C}$ ]-vinpocétine. Néanmoins, la [ $^{11}\text{C}$ ]-vinpocétine a l'inconvénient d'être très lipophile, ce qui entraîne une fixation non-spécifique très importante. Par ailleurs, des données pharmacologiques ont montré que la vinpocétine se fixe sur d'autres récepteurs cérébraux avec une affinité similaire à celle pour la TSPO (récepteurs adrénergiques  $\alpha_{2A}$  et  $\alpha_{2B}$ , canaux ioniques), et n'est donc pas sélective de la TSPO (Gulyas et al 2005).



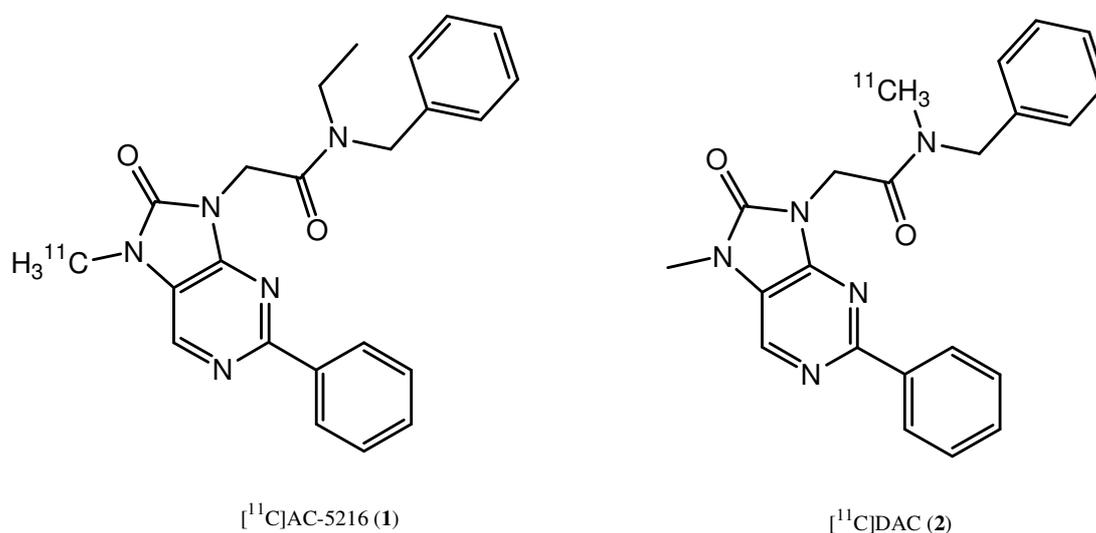
**Figure 13.** Images TEP obtenues chez un même patient atteint de sclérose en plaques avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 (gauche) et la [ $^{11}\text{C}$ ]-vinpocétine (droite) (Vas et al 2008).

#### ***4. Les oxodihydropurines***

##### ***4.1 L'AC-5216***

L'AC-5216, ou *N*-benzyl-*N*-éthyl-2-(7-méthyl-8-oxo-2-phényl-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)acétamide (Figure 14 (1)) a également été décrit comme nouveau radioligand de la TSPO marqué au carbone 11 (Amitani et al 2006). Sa caractérisation pharmacologique a montré une haute affinité pour la TSPO ( $K_i = 0,297$  nM, sur préparation mitochondriale de cerveau de rat versus  $K_i = 0,602$  nM pour le PK11195) et un caractère lipophile modéré ( $c \log P = 3,5$ )

autorisant le passage de la BHE (Zhang et al 2007b). Le [ $^{11}\text{C}$ ]-AC-5216 a été évalué *in vivo* dans des modèles animaux de fibrosarcome (Amitani et al 2006) et d'excitotoxicité cérébrale (Yanamoto et al 2007), ainsi que chez le singe (Zhang et al 2007b). Le [ $^{11}\text{C}$ ]-AC-5216 présente le même profil de distribution cérébrale que le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 chez la souris et le singe, et des examens TEP réalisés sur le même singe avec ces 2 radioligands ont mis en évidence une fixation cérébrale 6 fois plus importante avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-AC-5216. Ce composé subit un fort métabolisme plasmatique, mais n'est que très peu dégradé dans le cerveau (95 % du signal mesuré dû au composé lui-même). Néanmoins, une étude de compétition avec le PK11195 dans un modèle d'excitotoxicité unilatérale a mis en évidence une augmentation du signal mesuré dans les structures cérébrales intactes, par déplacement de la fixation spécifique périphérique du traceur. Ce résultat suggère fortement une considérable non-spécificité de l'accumulation du [ $^{11}\text{C}$ ]-AC-5216 dans le cerveau. Cependant, le traceur a récemment été étudié chez l'homme sain (Miyoshi et al 2009), montrant une distribution similaire à celle décrite dans de précédentes études avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195.



**Figure 14. Structure chimique des composés de la série oxodihydropurine radiomarqués au carbone 11 pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation.**

## 4.2 Le DAC

Le [ $^{11}\text{C}$ ]-DAC (Figure 14 (2)) est un dérivé structurellement très proche du précédent. Il a été évalué en microTEP dans un modèle de lésion excitotoxique à l'acide kaïnique chez le rat (Yanamoto et al 2009), et dans un modèle tumoral chez la souris (Yamasaki et al 2009). Le [ $^{11}\text{C}$ ]-DAC possède une affinité et une sélectivité pour la TSPO équivalentes à celles de le [ $^{11}\text{C}$ ]-AC-5216, mais un caractère lipophile moins marqué sans doute à l'origine d'une fixation cérébrale non spécifique moindre. En effet, les études de déplacement du traceur avec un excès de PK11195 dans le modèle d'excitotoxicité unilatérale ont mises en évidence une diminution du signal radioactif mesuré, contrairement à ce qui avait été précédemment observé avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-AC-5216. Aucun dérivé fluoré n'a à ce jour été décrit pour cette série.

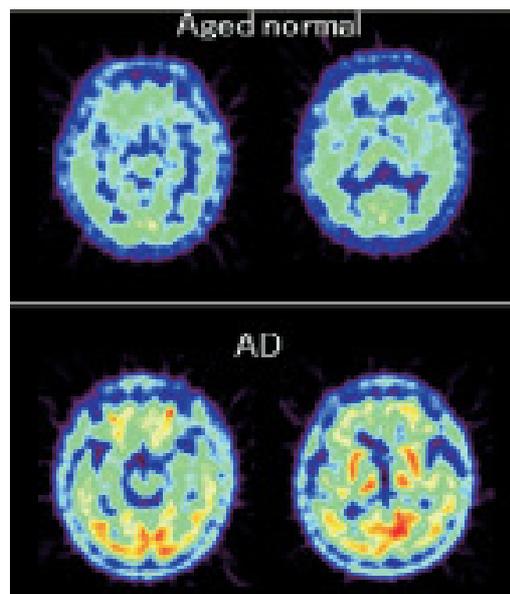
## 5. Les dérivés phénoxyaryl-acétamide

La série des dérivés phénoxyaryl-acétamide a été obtenue par ouverture du cycle diazépine du Ro5-4864. Ces composés présentent une très forte affinité et sélectivité pour la TSPO (Okuyama et al 1999).

### 5.1 Le DAA1106

Le DAA1106, ou *N*-(2,5-diméthoxybenzyl)-*N*-(5-fluoro-2-phénoxyphenyl)acétamide, est le premier ligand de cette série à avoir été décrit (Chaki et al 1999). Cet antagoniste de la TSPO possède une bonne sélectivité et une meilleure affinité pour cette protéine que le PK11195 ( $K_d = 0,12$  nM versus  $> 4$  nM pour le PK11195). Le DAA1106 marqué au carbone 11 (Figure 16 (1)) a été étudié chez la souris, le rat et le singe (Maeda et al 2004; Zhang et al 2003a), et a montré une fixation importante, environ 4 fois supérieure à celle du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 dans le cerveau de singe. Cette fixation cérébrale du [ $^{11}\text{C}$ ]-DAA1106 a été bloquée

par un prétraitement par le DAA1106 ou le PK11195 froids. Environ 80% du signal mesuré a pu être attribué à la fixation spécifique du radioligand sur la TSPO, ce qui a permis de contourner en partie les problèmes de fixation non spécifiques rencontrés avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 *in vivo*. Il a également été montré que le [ $^{11}\text{C}$ ]-DAA1106 pouvait détecter l'activation microgliale dans différents modèles animaux de neuroinflammation (Venneti et al 2007a; Venneti et al 2007b). Enfin, le [ $^{11}\text{C}$ ]-DAA1106 a été évalué chez l'homme *in vivo* afin d'en déterminer le BP pour la TSPO chez l'individu sain (Ikoma et al 2007), et dans une étude clinique étudiant l'activation microgliale dans la maladie d'Alzheimer (Yasuno et al 2008). Cette étude a montré un BP significativement plus élevé chez les patients Alzheimer que chez les individus contrôle, suggérant une activation microgliale diffuse dans tout le cortex (Figure 15).



**Figure 15. Images scintigraphiques réalisées 1 heure après l'injection de [ $^{11}\text{C}$ ]-DAA1106 chez un sujet atteint de la Maladie d'Alzheimer (bas) et chez un individu contrôle apparié en âge au patient (haut) (Yasuno et al 2008).**

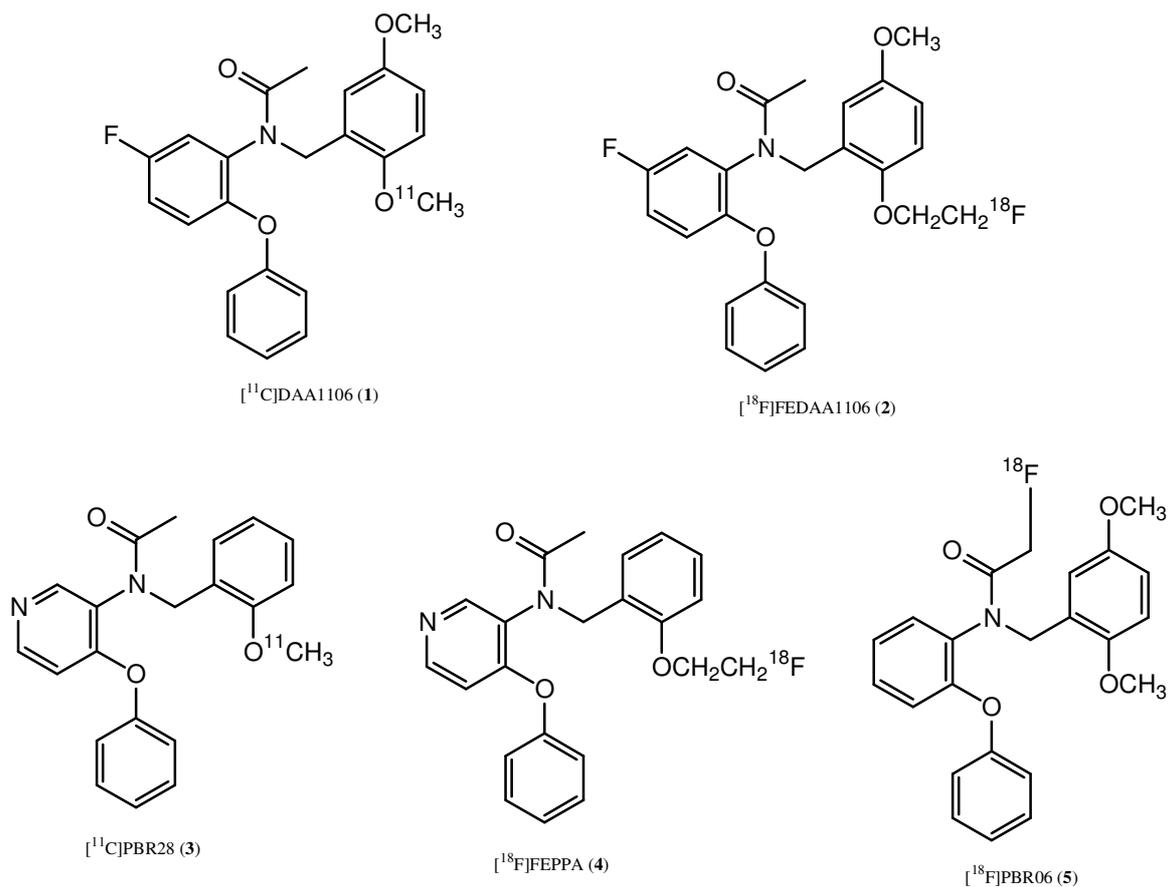
Le principal inconvénient du [<sup>11</sup>C]-DAA1106 est son métabolisme plasmatique intense et rapide, puisque seulement 6 % de l'activité plasmatique mesurée est due à la forme inchangée de la molécule 60 minutes après administration (Zhang et al 2003a).

### 5.2 Le FEDAA1106

Le dérivé fluoro-éthyl du DAA1106 (FEDAA1106), a été radiomarqué au fluor 18 (Zhang et al 2003b) (Figure 16 (2)). Possédant une bonne affinité *in vitro* pour la TSPO ( $K_i = 0,16$  nM sur des coupes de cerveau de rat), sa distribution cérébrale chez la souris et le singe correspond à celle de la TSPO (Zhang et al 2004b). Le [<sup>18</sup>F]-FEDAA1106 subit un fort métabolisme plasmatique (25 % du composé intact retrouvé 60 minutes post-injection), mais moindre que celui du [<sup>11</sup>C]-DAA1106. Sa capacité à visualiser la microglie activée a été validée dans un modèle de souris transgénique de la maladie d'Alzheimer (Maeda et al 2007b) et le [<sup>18</sup>F]-FEDAA1106 a été évalué chez l'Homme sain dans des études de quantification de son BP pour la TSPO (Fujimura et al 2006), et d'analyse compartimentale (Shidahara et al 2008).

Les synthèses d'un dérivé iodé du DAA1106 et d'un dérivé marqué au carbone 11 du FEDAA1106 ont également été publiées (Wang et al 2009a; Zhang et al 2007a).

Le [<sup>11</sup>C]-DAA1106 et le [<sup>18</sup>F]-FEDAA1106 ont tous les 2 une fixation cérébrale très rapide et quasi-irréversible (à l'échelle de la durée d'un examen TEP). Ces propriétés cinétiques compliquent la quantification du signal recueilli, car on mesure d'avantage la distribution cérébrale du radioligand que sa liaison spécifique à la TSPO (Briard et al 2008). Cette constatation a mené au développement d'autres ligands radiomarqués de la famille des dérivés phénoxyaryl-acétamide.



**Figure 16. Structure chimique des composés de la série phénoxyaryl-acétamide radiomarqués au carbone 11 ou au fluor 18 pour l'imagerie de la neuroinflammation.**

### 5.3 Le PBR28

Le PBR28 ou *N*-acétyl-*N*-(2-méthoxybenzyl)-2-phénoxy-5-pyridinamine (Figure 16 (3)) est un analogue proche du DAA1106, avec un noyau pyridine remplaçant un noyau benzénique. Cette pharmacomodulation permet de conserver l'affinité pour la TSPO ( $K_i = 2,47$  nM, sur préparation mitochondriale humaine, (Briard et al 2008), un bon passage de la BHE, tout en diminuant le caractère lipophile de la molécule ( $c \log P = 3,0$  pour le PBR28, contre 4,3 pour le DAA1106 et 5,3 pour le PK11195 (Briard et al 2008)) et en améliorant ses paramètres pharmacocinétiques chez le singe et chez l'homme (Brown et al 2007; Imaizumi et al 2008). Le PBR28 marqué au carbone 11 a mis en évidence l'activation microgliale dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat (Imaizumi et al 2007b) et a fait l'objet d'études

pharmacocinétiques (Fujita et al 2008) et dosimétriques (Brown et al 2007) chez l'homme sain. Néanmoins, il a été montré que le [ $^{11}\text{C}$ ]-PBR28 subissait un métabolisme cérébral non négligeable et qu'une part significative du signal détecté provient de métabolites radiomarqués, ce qui limite la quantification TEP de l'expression de la TSPO avec cette molécule (Briard et al 2008). Une voie de radiosynthèse optimisée du [ $^{11}\text{C}$ ]-PBR28 a également récemment été décrite (Wang et al 2009b).

#### **5.4 Le FEPPA**

Le FEPPA, ou *N*-acétyl-*N*-(2-méthoxybenzyl)-2-phénoxy-fluoroethyl-5-pyridinamine (Figure 16 (4)) est un analogue du PBR28 radiomarqué au fluor 18 (Wilson et al 2008). Il possède une meilleure affinité *in vitro* pour la TSPO que le PBR28 ( $K_i = 0,07$  nM, sur préparation mitochondriale de cerveau de rat versus  $K_i = 0,22$  nM) et un caractère lipophile équivalent. Le [ $^{18}\text{F}$ ]-FEPPA présente une distribution cérébrale chez le rat correspondant aux régions riches en TSPO, un passage de la BHE augmenté par rapport au PBR28, et un métabolisme beaucoup moins important (seulement 5 % de la radioactivité cérébrale due à des métabolites radiomarqués). Néanmoins, la fixation spécifique du [ $^{18}\text{F}$ ]-FEPPA sur la TSPO *in vivo* n'a pu être mise en évidence par le déplacement du radioligand de sa cible par un excès de PBR28 ou de FEPPA froid. Il est donc nécessaire d'approfondir l'évaluation du [ $^{18}\text{F}$ ]-FEPPA chez l'animal, avant d'envisager d'éventuelles études en recherche clinique.

#### **5.5 Le PBR06**

Le PBR06, ou *N*-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoroacétyl-*N*-(2,5diméthoxybenzyl)-2-phénoxyaniline (Figure 16 (5)) est également un dérivé phénoxyaryl-acétamide fluoré. Bien qu'il s'agisse d'un composé récemment décrit, et qui n'a à ce jour fait l'objet que de 2 publications scientifiques (Fujimura et al 2009; Imaizumi et al 2007a), son évaluation chez l'homme sain a déjà été

rapportée (Fujimura et al 2009), ce qui illustre la volonté actuelle des groupes de recherche d'évaluer le plus rapidement possible un nouveau traceur prometteur chez l'homme, et ce afin de sélectionner les molécules ayant un réel potentiel en recherche clinique. Le [<sup>18</sup>F]-PBR06 a également été évalué en TEP chez le singe, montrant une spécificité de liaison à la TSPO et une stabilité *in vivo* satisfaisantes, mais sa réelle capacité à quantifier l'activation microgliale dans un modèle animal de neuroinflammation robuste reste à déterminer.

Les dérivés phénoxyaryl-acétamide présentent donc une forte affinité *in vitro* pour la TSPO et un caractère lipophile moins important que le PK11195, ce qui suggère une fixation cérébrale non spécifique moindre. Marqués au carbone 11 ou au fluor 18, ces radioligands ont montré leur capacité à détecter l'activation microgliale dans différents modèles animaux. Quatre de ces composés ont été utilisés en recherche clinique ([<sup>11</sup>C]-DAA1106, [<sup>11</sup>C]-PBR28, [<sup>18</sup>F]-FEDAA1106, [<sup>18</sup>F]-PBR06), le premier cité permettant de visualiser le processus neuroinflammatoire dans la maladie d'Alzheimer (Yasuno et al 2008). Cependant, ces composés présentent un certain nombre d'inconvénients pour la quantification par TEP (fixation spécifique irréversible, fixation non spécifique non négligeable et variable d'une étude à l'autre, métabolisme cérébral), qui n'ont pu pour le moment être résolus par le développement de nouveaux dérivés.

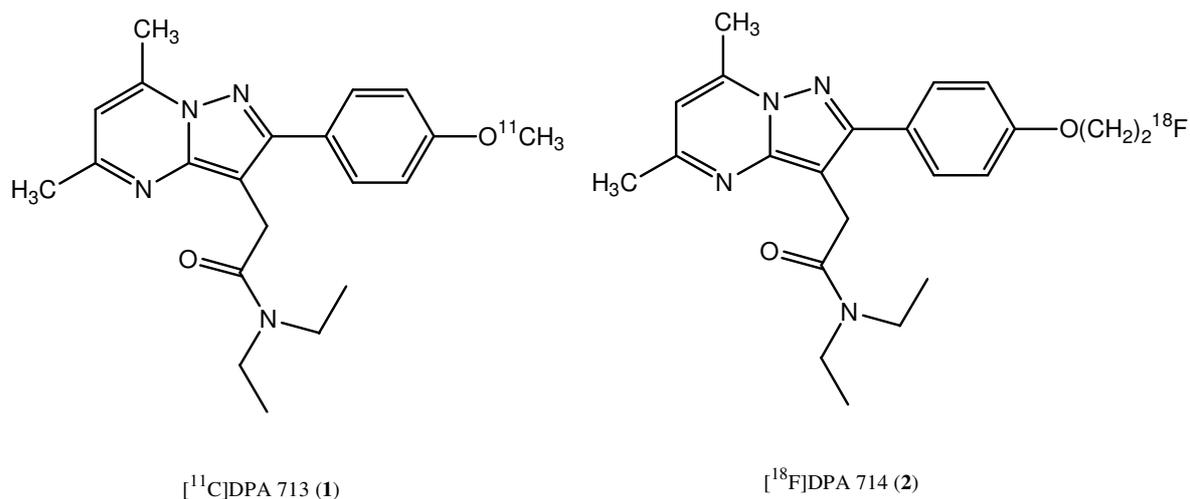
## **6. Les dérivés pyrazolo[1,5-a]pyrimidine**

La série des dérivés pyrazolo[1,5-a]pyrimidine a été publiée en 2001 (Selleri et al 2001) et compte actuellement 2 candidats prometteurs pour l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation : le [<sup>11</sup>C]-DPA-713 et le [<sup>18</sup>F]-DPA-714, développés par le « Brain and

Mind Research Institute » de Sydney, Australie, sous la direction du Dr Kassiou, en collaboration avec l'UMR Inserm U930 de Tours pour le [<sup>18</sup>F]-DPA-714.

### **6.1 Le DPA-713**

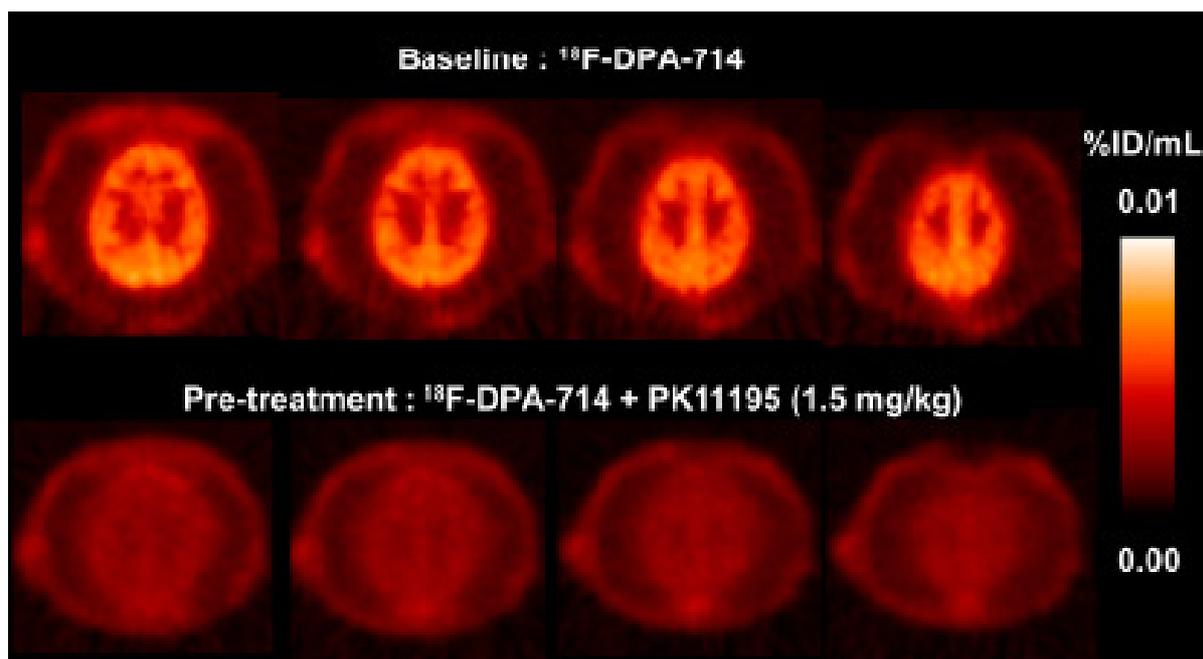
Le DPA-713, ou *N,N*-diéthyl-2-[2-(4-méthoxyphényl)-5,7-diméthyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-acétamide (Figure 17 (1)), présente un caractère lipophile plus faible que le PK11195, et une bonne affinité *in vitro* pour la TSPO ( $K_i = 4,7$  nM sur tissu de rein de rat) (James et al 2005). Chez le babouin, une pré-injection d'un excès de PK11195 froid bloque environ 70 % de la fixation cérébrale du [<sup>11</sup>C]-DPA-713, indiquant une bonne spécificité de liaison du radioligand sur la TSPO. La cinétique relativement lente du [<sup>11</sup>C]-DPA-713, avec un pic de fixation maximale 20 minutes post-injection, autorise une quantification précise du signal mesuré. La radiosynthèse a été optimisée (Thominiaux et al 2006), et le [<sup>11</sup>C]-DPA-713 a été évalué dans un modèle d'inflammation chez le rat, où il a montré son aptitude à visualiser la microglie activée avec un signal spécifique de la TSPO et un BP supérieurs au [<sup>11</sup>C]-PK11195, en raison d'une fixation cérébrale non spécifique beaucoup plus faible (Boutin et al 2007a). Le [<sup>11</sup>C]-DPA-713 a été récemment évalué chez l'homme sain (Endres et al 2009), et a montré une cinétique et une stabilité *in vivo* permettant une quantification précise de la fixation cérébrale spécifique du traceur.



**Figure 17. Structure chimique des composés de la série pyrazolo[1,5-a]pyrimidine radiomarqués au carbone 11 ou au fluor 18 pour l'imagerie de la neuroinflammation.**

### 6.2 Le DPA-714

Le DPA-714, ou *N,N*-diéthyl-2-(2-[4-(2-fluoroéthoxy)-phényl]-5,7-diméthylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-acétamide (Figure 17 (2)), présente une affinité *in vitro* pour la TSPO légèrement inférieure à celle du DPA-713 mais néanmoins satisfaisante ( $K_i = 7,0$  nM sur tissu de rein de rat, mesuré par déplacement du  $[^3\text{H}]$ -PK11195), et une excellente sélectivité pour la TSPO vis à vis du CBR. Il possède un caractère lipophile modéré, identique au DPA-713 (James et al 2008). Le  $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 a permis de visualiser la microglie activée chez le rat dans un modèle de lésion excitotoxique (James et al 2008) et dans un modèle d'ischémie cérébrale (Martin et al 2009), par liaison spécifique à la TSPO, inhibée par un prétraitement avec un excès de PK11195, de DPA-713 ou de DPA-714 froids. Chez le singe, le  $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 passe la BHE de manière satisfaisante et s'accumule dans le cerveau avec une bonne spécificité pour la TSPO, caractérisée par un prétraitement au PK11195 (Figure 18) (James et al 2008).



**Figure 18.** Image TEP obtenue 1 heure post-injection de 100 MBq de [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA-714 avec (bas) ou sans (haut) pré-injection d'un excès de PK11195 (James et al 2008).

Le [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA-714 est actuellement évalué chez l'homme dans le cadre d'un PHRC dont le CHU de Tours est promoteur, portant sur l'étude de la neuroinflammation dans la sclérose latérale amyotrophique (Le Pogam et al 2008). Le [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA-714 représente actuellement l'une des molécules les plus prometteuses pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation dans les atteintes neurologiques, bien que sa validation chez l'homme requiert encore des travaux complémentaires de modélisation pharmacocinétique et de quantification.

Le [ $^{11}\text{C}$ ]-DPA-713 et le [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA-714 ont également été étudiés conjointement et comparés au ligand TEP de référence, le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195. Deux modèles animaux ont été utilisés : un modèle de lésion excitotoxique unilatérale (Chauveau et al 2009) et un modèle d'encéphalite herpétique (Doorduyn et al 2009). Les 2 études n'ont pas trouvé de différence entre les résultats obtenus avec les traceurs marqués au carbone 11 (avec toute fois une fixation non spécifique plus faible du [ $^{11}\text{C}$ ]-DPA-713 dans le modèle d'encéphalite

herpétique). Dans les 2 modèles, un meilleur rapport « signal-sur-bruit » a été constaté avec le [<sup>18</sup>F]-DPA-714, confirmant l'intérêt de ce dernier traceur.

### ***7. Les dérivés imidazo-[1,2-a]pyridine***

Les composés de cette série dérivent de l'alpidem, connu pour se lier au CBR et à la TSPO avec une affinité nanomolaire ( $K_i = 0,5$  à  $7$  nM et  $1$  à  $28$  nM, respectivement, (Selleri et al 2001)). L'alpidem est un anxiolytique commercialisé en 1991 sous la spécialité Ananxyl<sup>®</sup>, de structure proche du zolpidem (Stilnox<sup>®</sup>), et retiré du marché en 1994 suite à des cas d'hépatites aiguës lui ayant été imputés. Des travaux de pharmacomodulation de la structure chimique de l'alpidem ont permis d'augmenter sa sélectivité pour la TSPO par rapport au CBR (Trapani et al 1997). Les radioligands dérivés de cette série ont été développés par la division Radiopharmaceuticals Research Institute, de l'Australian Nuclear Science Technology and Organisation (ANSTO), Sydney, Australie, au sein de laquelle j'ai effectué un stage extra-hospitalier de 6 mois dans le cadre de ma formation de DES de Pharmacie Hospitalière, sous la direction du Dr Katsifis.

#### ***7.1 Le CLINME***

Le CLINME, ou 2-[6-chloro-2-(4-iodophényl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]-*N*-éthyl-*N*-méthyl-acétamide (Figure 19 (1)), présente des caractéristiques pharmacologiques *in vitro* satisfaisantes (affinité, caractère lipophile, (Boutin et al 2007b)). Marqué au carbone 11 (Thominiaux et al 2007), le CLINME a été évalué dans un modèle de lésion excitotoxique chez le rat, et comparé au [<sup>11</sup>C]-PK11195 (Boutin et al 2007b). Le [<sup>11</sup>C]-CLINME a montré dans ce modèle qu'il permettait de visualiser la microglie activée avec une meilleure sensibilité que le [<sup>11</sup>C]-PK11195, du fait d'un signal de bruit de fond plus faible. Cette

fixation était bloquée par un prétraitement au PK11195, suggérant une fixation spécifique du radioligand sur la TSPO *in vivo*. Aucune donnée portant sur la validation du [<sup>11</sup>C]-CLINME chez le primate non humain, voire chez l'homme n'a été publiée.

### 7.2 Le PBR111

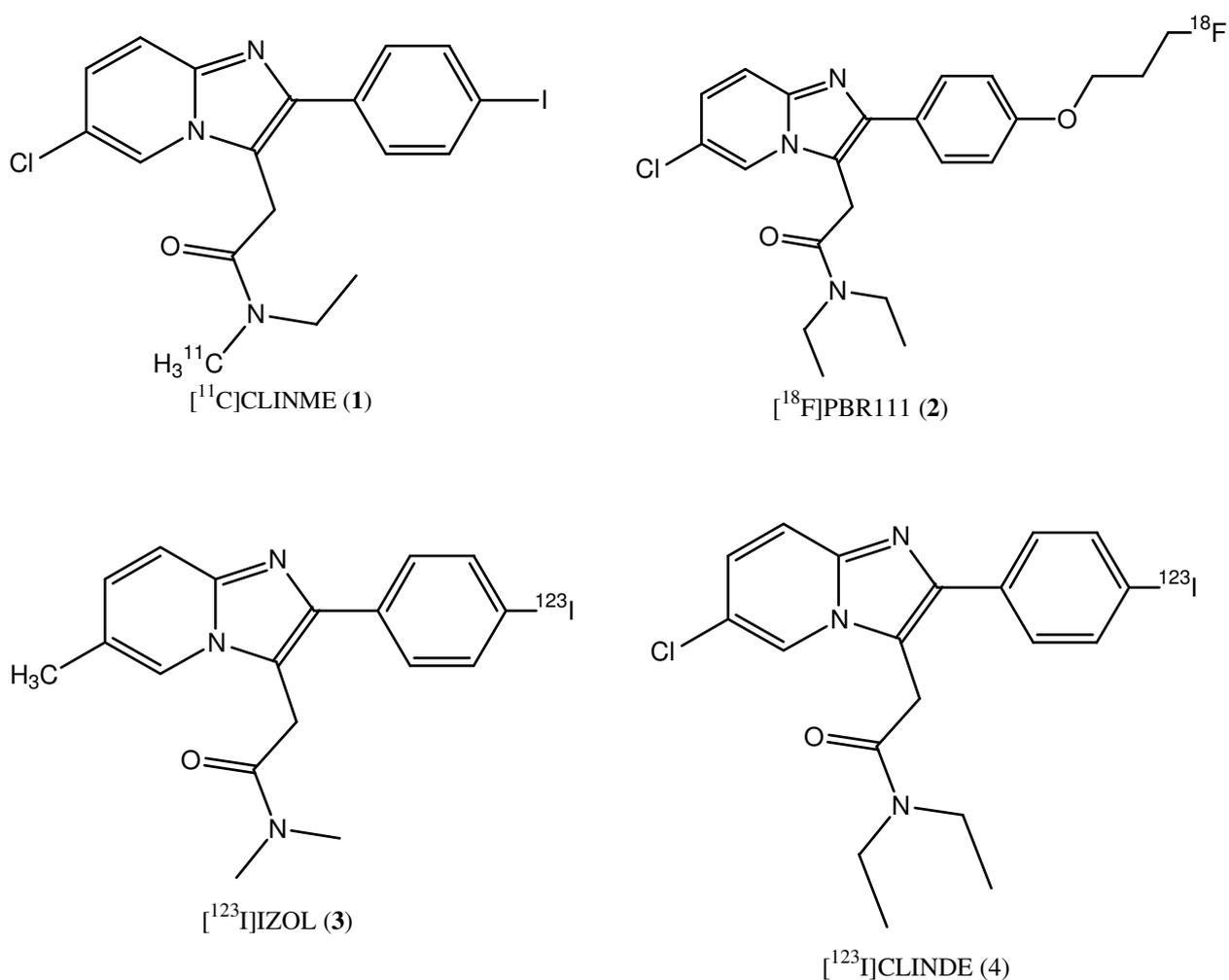
Le dérivé fluoré de cette série est le PBR111, ou fluoropropoxy-2-(6-chloro-2-phényl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-*N,N*-diéthylacétamide (Figure 19 (2)). Il possède une bonne affinité pour la TSPO ( $K_i = 3,7$  nM sur tissu de rein de rat, mesuré par déplacement du [<sup>3</sup>H]-PK11195), une bonne sélectivité vis à vis du CBR ( $K_i$  (CBR) = 800 nM), et un caractère lipophile modéré ( $c \log P = 3,2$ ). Chez le rat non lésé, la distribution cérébrale *in vivo* du [<sup>18</sup>F]-PBR111 correspond aux structures riches en TSPO, notamment le bulbe olfactif, et 86 % de la radioactivité cérébrale mesurée correspond au radioligand non métabolisé. La fixation du [<sup>18</sup>F]-PBR111 apparaît également spécifique de la TSPO car inhibée par une pré-injection de PK11195 froid (Fookes et al 2008). Une étude récente réalisée dans un modèle d'inflammation chez le rat montre une très bonne stabilité *in vivo*, une fixation importante et spécifique de la microglie, déplacée rapidement par le PK11195 et le PBR111 froids (van Camp et al 2008). Ainsi, le [<sup>18</sup>F]-PBR111 semble un composé de grand intérêt pour la clinique, et son évaluation chez le primate non humain est actuellement en cours.

### 7.3 Les dérivés imidazo-[1,2-a]pyridine utilisables en TEMP :

#### *[<sup>123</sup>I]-IZOL et [<sup>123</sup>I]-CLINDE*

Le [<sup>123</sup>I]-IZOL, ou *N,N*-diméthyl-6-méthyl-(4'-[<sup>123</sup>I]iodophényl)imidazo[1,2-a]pyridine-3-acétamide (Figure 19 (3)), a la particularité de dériver du zolpidem. Il possède une affinité *in vitro* et une spécificité de liaison *in vivo* pour la TSPO chez le rat moyennes ( $K_d = 30$  nM, et déplacement de seulement 30 % de l'activité lors de l'administration de

PK11195 froid) (Mattner et al 2006). De ce fait, aucune étude complémentaire portant sur ce radioligand n'a été menée. Le [ $^{123}$ ]-CLINDE, ou 6-chloro-2-(4'iodophényl)-3-(*N,N*-diéthyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acétamide (Figure 19 (4)), possède des propriétés pharmacologiques plus intéressantes qui seront détaillées dans la troisième partie de ce manuscrit.



**Figure 19. Structure chimique des composés de la série imidazo-[1,2-*a*]pyridine pour l'imagerie moléculaire TEP (1, 2) ou TEMP (3, 4) de la neuroinflammation.**

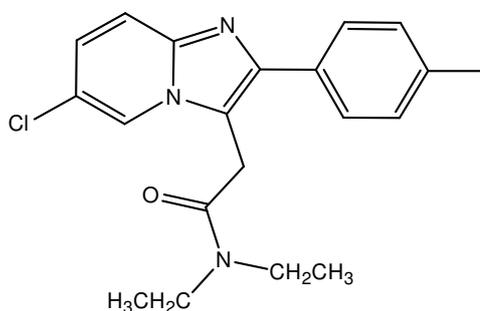
## Troisième partie

# Evaluation préclinique du CLINDE

# I. Travail expérimental : contexte et objectifs

## A. Le CLINDE

Le 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-(*N,N* diethyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acétamide ou CLINDE (Figure 20) est un ligand de haute affinité pour la TSPO de la série des composés imidazo[1,2-*a*]pyridine, initialement développé par le département « Radiopharmaceuticals Research Institute », de « l'Australian Nuclear Science and Technology Organisation », (ANSTO, Sydney, Australie) (Katsifis et al 2000a; Katsifis et al 1997).



**Figure 20.** 6-chloro-2-(4'iodophenyl)-3-(*N,N* diethyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acétamide : CLINDE

Le CLINDE peut être radiomarqué avec les différents isotopes de l'iode. Radiomarqué à l'iode 123 (demi-vie de 13,2 heures, émetteur de photons  $\gamma$  d'énergie égale à 159 keV (83%), peu irradiant et bien adapté aux gamma-caméras utilisées en clinique), il peut avoir des applications diagnostiques potentielles en imagerie TEMP, alors que marqué à l'iode 125 (demi-vie de 60 jours, émetteur de photons  $\gamma$  d'énergie égale à 35 keV, sans application en imagerie clinique du fait de l'atténuation des rayonnements par les tissus), il est utilisable en recherche préclinique sur le petit animal pour des études *in vitro* et *ex vivo*. Le CLINDE n'a pour le moment pas été radiomarqué avec d'autres isotopes radioactifs de l'iode (iode 124 et iode 131).

La validation pharmacologique *in vitro* et *in vivo* du CLINDE chez le rongeur sain a été décrite en 2008 par le département « Radiopharmaceuticals Research Institute », de l'ANSTO (Mattner et al 2008). L'affinité du CLINDE pour la TSPO a été étudiée *in vitro* par détermination du  $K_d$  sur des préparations mitochondriales de glande corticosurrénale, de rein, et de cortex de rat, en compétition avec le [ $^3\text{H}$ ]-PK11195. Les valeurs de  $K_d$  obtenues sont respectivement de 12,6, 0,20, et 3,84 nM. Le CLINDE est sélectif de la TSPO vis à vis du CBR ( $K_d = 360$  nM, cortex).

La biodistribution *ex vivo* du [ $^{123}\text{I}$ ]-CLINDE chez le rat, indique une fixation préférentielle dans les corticosurrénales, le cœur et le rein, organes périphériques exprimant fortement la TSPO. Dans le SNC, les bulbes olfactifs présentent le niveau de radioactivité le plus élevé : plus de 6 fois l'activité plasmatique. La pré-administration de CLINDE, PK11195 ou Ro5-4864 (1 mg/kg) réduit significativement la fixation du [ $^{123}\text{I}$ ]-CLINDE dans le cerveau, alors que le flumazénil, ligand de haute affinité pour le CBR et de faible affinité pour la TSPO, n'a pas d'effet sur la distribution du [ $^{123}\text{I}$ ]-CLINDE.

Le CLINDE ne subit pas de métabolisme cérébral pendant un minimum de 3 heures post-injection (> 90 % de forme inchangée).

Le [ $^{123}\text{I}$ ]-CLINDE possède donc les prérequis à l'exploration *in vivo* de la neuroinflammation par imagerie moléculaire TEMP. Avant d'envisager son utilisation chez l'homme, il est cependant nécessaire d'étudier ses potentialités dans des modèles animaux de pathologies humaines.

## **B. Choix des modèles animaux**

Dans le cerveau humain normal, l'expression physiologique de la TSPO est faible mais bien présente et détectable, même en l'absence de tout processus neuroinflammatoire (Rao & Butterworth 1997). Cet élément peut induire une confusion entre la fixation cérébrale non spécifique d'un radioligand donné et sa fixation à la TSPO exprimée à bas bruit de façon diffuse dans l'ensemble du cerveau, ce qui complique la validation de nouveaux radioligands chez l'homme.

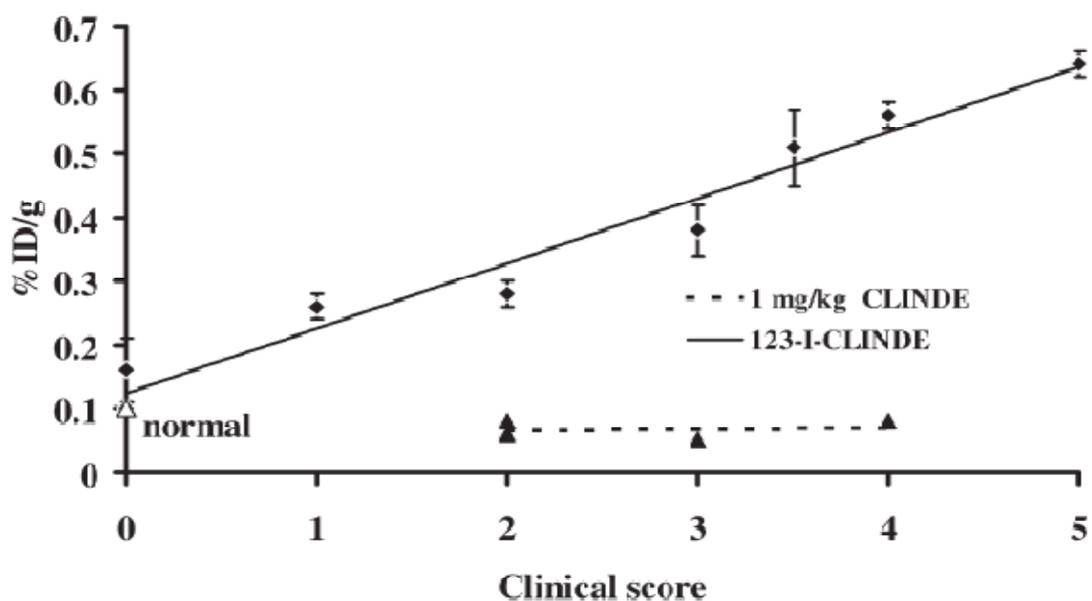
Par ailleurs, la bibliographie montre que les protocoles d'évaluation de nouveaux radioligands de la TSPO impliquant des primates non humains ont tous été menés sur des animaux sains, soit dans le cadre d'études de dosimétrie, soit pour des études de cinétique *in vivo* et de recherche d'éventuels métabolites (Imaizumi et al 2008; James et al 2008; Zhang et al 2004b).

Le cerveau de rongeur présente au contraire l'avantage d'exprimer des niveaux de TSPO indétectables en l'absence de neuroinflammation, mis à part dans les bulbes olfactifs et le plexus choroïde (Benavides et al 1983). Par conséquent, la fixation non spécifique d'un radioligand ciblant la TSPO peut être estimée chez le rongeur directement à partir de son intensité de fixation totale dans le parenchyme cérébral normal. Du fait de cette quasi-absence d'expression de la TSPO dans le cerveau du rongeur sain, les études de biodistribution cérébrale en l'absence de lésion inflammatoire ne sont pas assez robustes pour évaluer et discriminer de façon rigoureuse de nouveaux ligands potentiels, ce qui rend indispensable le recours à des modèles animaux de neuroinflammation pertinents. Chez le rongeur, la grande diversité des modèles de neuroinflammation existants et des protocoles d'évaluation de radioligands de la TSPO associés rend difficile l'évaluation comparative des différentes molécules radiomarquées candidates.

Le CLINDE a précédemment été évalué dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune (EAE) chez le rat mâle de souche Lewis (Mattner et al 2005). Ce modèle d'EAE peut être induit chez le rongeur par immunisation avec la protéine basique de la myéline (MBP), qui provoque des lésions diffuses dans le parenchyme cérébral et la moelle épinière, accompagnées d'une réaction inflammatoire évolutive médiée par les lymphocytes T. Une démyélinisation neuronale est également observée dans l'EAE, ce qui en fait un modèle animal de pathologies humaines inflammatoires et démyélinisantes, en particulier de la sclérose en plaques. Le CLINDE marqué à l'iode 123 a montré dans ce modèle sa capacité à visualiser la neuroinflammation, ainsi que la saturabilité de sa liaison à la TSPO (mise en évidence par une étude de compétition avec un excès de CLINDE froid), et une excellente corrélation spatiale avec la présence de cellules de la microglie activée visualisées par immunohistochimie.

Cependant, la neuroinflammation induite dans le modèle d'EAE affecte le cerveau dans sa globalité, ce qui exclut la possibilité de définir une région de référence pour évaluer la fixation non spécifique du radioligand. Par conséquent, il nous a semblé intéressant d'évaluer le CLINDE dans un modèle de lésion focale, dans lequel la neuroinflammation n'est induite que dans un seul hémisphère cérébral, le côté controlatéral servant de région de référence pour évaluer la fixation non spécifique.

Par ailleurs, les travaux réalisés dans le modèle d'EAE ont mis en évidence une relation quantitative entre l'intensité de la fixation du CLINDE et le « score clinique » associé à la lésion (Figure 21).



**Figure 21.** Intensité de la fixation du [ $^{123}\text{I}$ ]-CLINDE dans le SNC, exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu, en fonction du « score clinique » de l'EAE, et effet d'un pré-traitement avec un excès de CLINDE « froid » (Mattner et al 2005).

Ce résultat implique que le degré de l'activation microgliale soit fortement corrélé à celui de l'atteinte neuronale. Par conséquent, nous avons également souhaité travailler sur un modèle permettant de moduler l'intensité de la lésion et de l'expression de la microglie activée. Dans la première partie de ce travail expérimental, nous avons utilisé un modèle de lésion excitotoxique striatale unilatérale à l'acide quinolinique, en injectant l'excitotoxine à plusieurs concentrations, de sorte à produire différents degrés de neuroinflammation.

L'excitotoxicité se définit comme le phénomène de mort cellulaire (toxicité) induite par des acides aminés excitateurs (AAE). Le potentiel excitateur des acides aminés endogènes, le glutamate et l'aspartate présents dans différentes régions cérébrales, a été découvert dans les années 60 (Curtis & Watkins 1960). Il est caractérisé par une conductance sodique et implique une dépolarisation neuronale (Curtis et al 1959). Le fait que les AAE

soient présents en forte quantité dans le cerveau et qu'ils fassent partie du métabolisme intermédiaire rendait peu probable leur rôle en tant que neurotransmetteur et leur rôle physiologique a été l'objet de nombreux débats dans les années 70. Aujourd'hui, le glutamate est considéré comme le neurotransmetteur excitateur principal dans le cerveau des vertébrés supérieurs, et par conséquent les substances pharmacologiques utilisés dans les modèles animaux d'excitotoxicité sont toutes des agonistes glutamatergiques.

Au terme de cette première partie expérimentale, nous avons recherché un modèle animal se rapprochant d'une future utilisation du CLINDE en recherche clinique, tout en conservant les avantages du modèle de lésion excitotoxique (lésion focale et d'intensité modulable). Une revue de la littérature et des échanges avec les cliniciens neurologues et médecins nucléaires suggèrent fortement l'intérêt d'un traceur de la neuroinflammation utilisable en imagerie TEMP dans l'étude de l'accident vasculaire cérébral (cet élément sera abordé dans les perspectives). Nous nous sommes donc intéressés aux modèles d'ischémie cérébrale chez le rongeur, modèles dont nous ne disposions pas au sein du laboratoire, contrairement au modèle de lésion excitotoxique à l'acide quinolinique. Pour mener à bien cette deuxième partie expérimentale, nous avons donc établi une collaboration scientifique avec le groupe CERVOxy « Hypoxie et physiopathologie cérébrovasculaire », du centre CYCERON à Caen. En effet, cette équipe de recherche est reconnue pour son expertise dans différents modèles animaux d'ischémie cérébrale. Les acquisitions par IRM ont également eu lieu à Caen.

L'ischémie cérébrale est définie comme l'interruption ou la forte réduction du flux sanguin, interrompant la distribution à la fois de l'oxygène et du glucose dans certaines structures cérébrales. On peut distinguer 3 catégories majeures de lésions ischémiques en fonction de leur physiopathologie (Hossmann 1998) : l'ischémie complète, le microembolisme et l'ischémie focale transitoire ou permanente.

Chez l'animal, une ischémie cérébrale complète peut être créée en provoquant un arrêt cardiaque (injection intracardiaque de produit cardioplégique, compression intrathoracique...). Mais, de nombreuses variantes techniques ont surtout été décrites sur la base de l'occlusion des carotides, qui à elle seule ne peut déclencher d'ischémie, sauf chez la gerbille, animal dont le polygone de Willis est incomplet. Pour les autres espèces, il faut cumuler l'occlusion des carotides avec une autre atteinte, telle la coagulation bilatérale préalable des artères vertébrales, ou une hypotension ou encore une augmentation de la pression intracrânienne.

Les méthodes de microembolisme consistent en l'injection intracarotidienne de microsphères calibrées, ou de bulles d'air, ou en l'induction d'une agrégation plaquettaire.

Ces 2 modèles présentent pour nous l'inconvénient d'induire une lésion globale (ischémie cérébrale complète) ou multifocale, et de distribution extrêmement inhomogène (microembolisme).

Nous avons donc choisi d'utiliser des modèles d'ischémie focale, entraînant une lésion restreinte à un seul hémisphère cérébral suite à l'arrêt du flux sanguin dans l'artère cérébrale moyenne (ACM), ce qui correspond en pathologie humaine aux AVC de l'artère sylvienne, rencontrés dans la majorité des cas. Des modèles d'occlusion de l'ACM ont été décrits chez le rat, la souris, la gerbille, le chat, le chien et le singe. L'occlusion peut être réalisée par la pose, selon différentes approches microchirurgicales, d'un clip, de façon définitive ou transitoire. Il est également possible d'introduire un dispositif obstructif dans la lumière vasculaire. Un modèle murin d'ischémie permanente par électrocoagulation de l'ACM, reproductible, a d'abord permis de valider la faisabilité de l'étude de la neuroinflammation par le [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans ces modèles d'ischémie. Puis, dans un second temps, nous avons utilisé un modèle d'ischémie transitoire par occlusion de l'ACM chez le rat. Ce modèle provoquant des infarctus de tailles très variables, nous avons étudié la relation entre l'intensité de la

neuroinflammation induite par l'ischémie dans des structures cérébrales distantes de la lésion primaire, associée au phénomène de diaschisis, et le volume de la lésion ischémique.

### **C. Objectifs du travail de thèse**

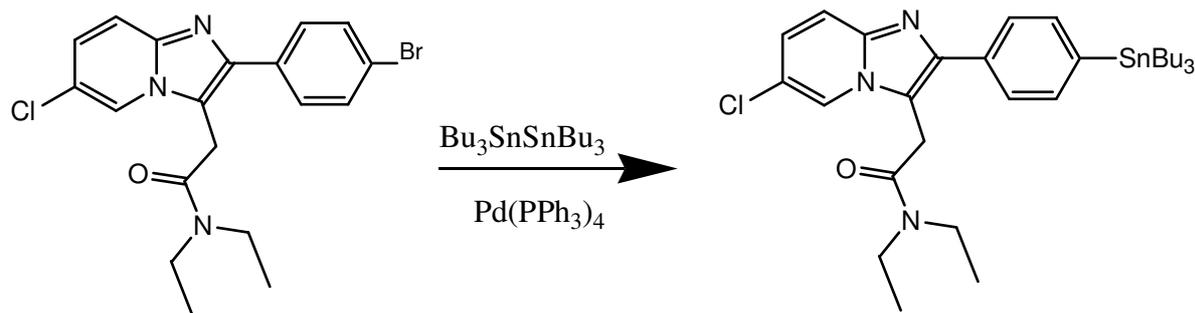
L'objectif de ce travail de thèse est de mieux caractériser le CLINDE, en mettant en parallèle les acquis principaux et les avancées réalisées en recherche préclinique, via des modèles animaux, avec la réalité clinique dans le champ de la neuroinflammation afin d'évaluer l'intérêt de ce nouveau radiopharmaceutique iodé utilisable en imagerie TEMP pour la recherche clinique. Nous avons également porté une attention particulière à la relation entre l'intensité d'une lésion cérébrale, excitotoxique ou ischémique, induite chez le rat, et le degré de la réaction microgliale associée, mesurée *ex vivo* par le [<sup>125</sup>I]-CLINDE.

## **II. Chimie et radiochimie du [<sup>125</sup>I]-CLINDE**

### **A. Matériels et méthodes**

#### ***1. Synthèse chimique***

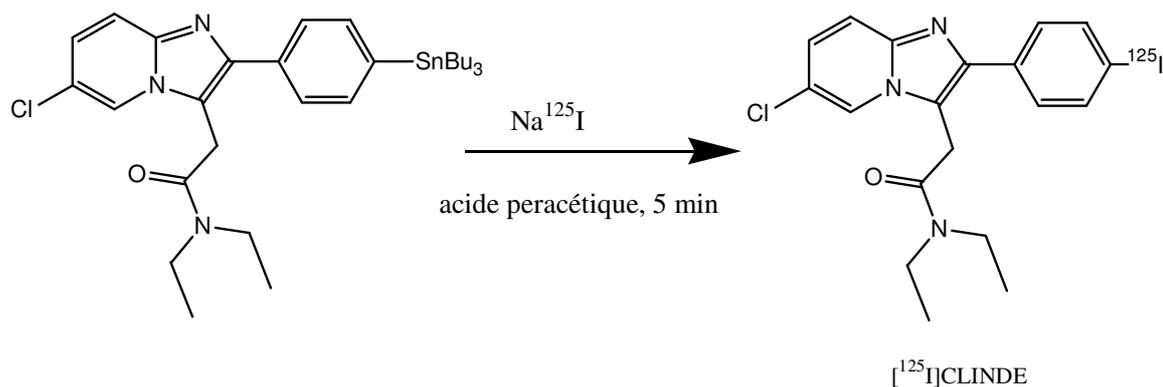
Le précurseur stannique du CLINDE nous a été fourni par l'ANSTO. Brièvement, le 4'-bromophényl et la 6-chloro-2-(4'-iodophényl)-3-(N,N-diéthyl)-imidazo[1,2-a]pyridine sont préparés selon la méthode décrite dans la littérature (Katsifis et al 1997). Le précurseur stannique est obtenu par traitement du dérivé bromé par le bis-tributylétain en présence de palladium, dans le toluène (Figure 22), jusqu'à ce que le milieu de réaction vire au noir (environ 12 heures). Le toluène est ensuite évaporé sous pression réduite, et le résidu purifié par CLHP. Le précurseur stannique se présente sous la forme d'une poudre blanche.



**Figure 22. Synthèse chimique du précurseur stannique du CLINDE**

## 2. Synthèse radiochimique

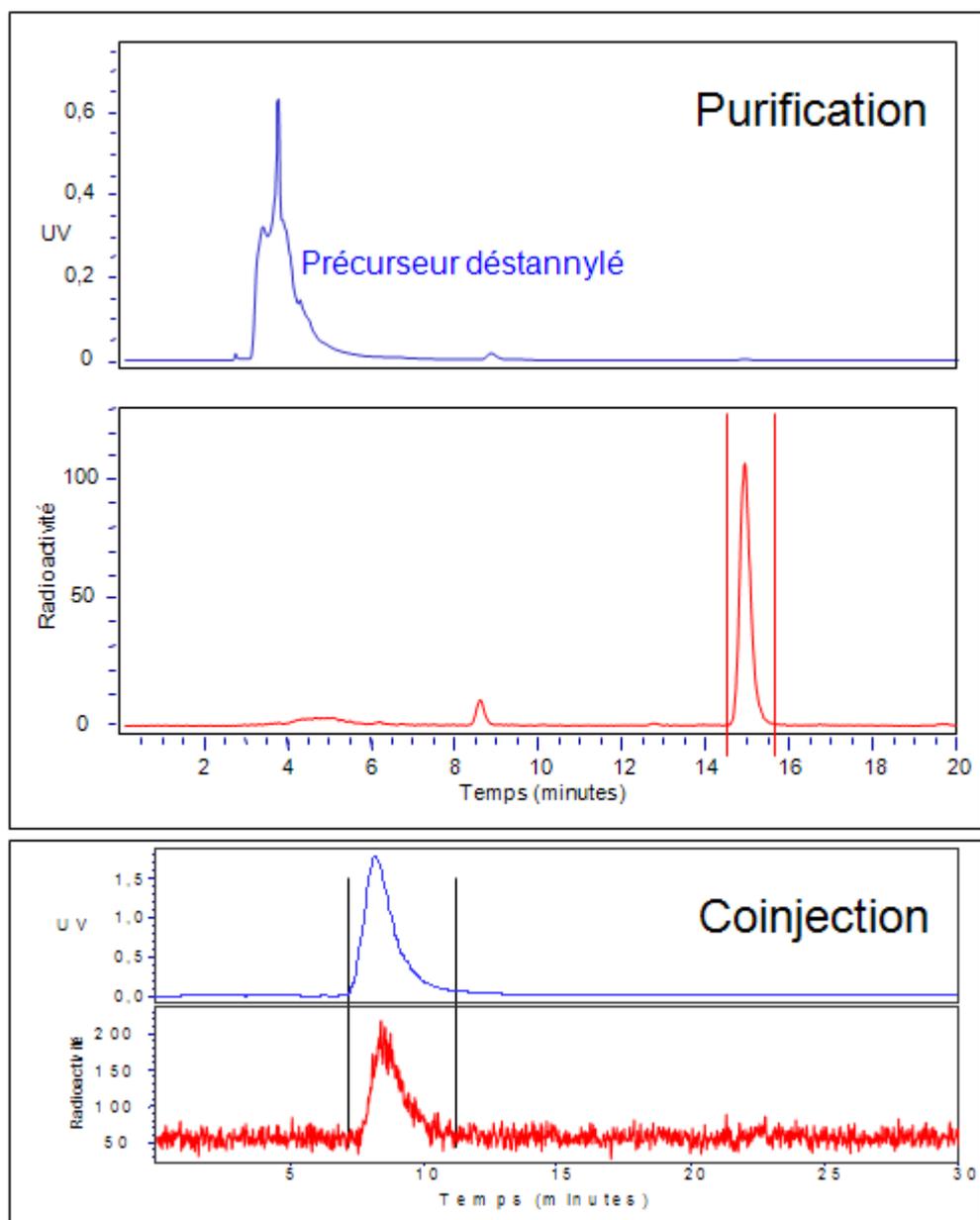
La synthèse radiochimique du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE est réalisée par substitution électrophile régiospécifique du groupement tributylétain par un atome d'iode  $^{125}\text{I}$  (Figure 23). Le mode opératoire est décrit dans la littérature (Katsifis et al 2000a). Le précurseur stannique (100  $\mu\text{g}$ ), repris dans 200  $\mu\text{L}$  d'acide acétique, est traité par une solution de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (activité spécifique 81,4  $\text{GBq}/\mu\text{mol}$  ; PerkinElmer, France) suivi d'un ajout d'acide peracétique (1-3 %, 100 $\mu\text{L}$ ) préparé extemporanément. L'acide peracétique oxyde  $^{125}\text{I}^-$  en  $^{125}\text{I}^+$ , capable de réagir avec le précurseur de CLINDE. Après 5 minutes, la réaction est arrêtée par l'ajout de 200  $\mu\text{L}$  de bisulfite de sodium (50  $\text{mg}/\text{mL}$ ) et de 200  $\mu\text{L}$  de bicarbonate de sodium (50  $\text{mg}/\text{mL}$ ). Le produit est ensuite purifié par CLHP en phase inverse (colonne semi-préparative C18 10 x 250 mm, Phenomonex), à débit constant de 4  $\text{mL} / \text{minute}$  (acétonitrile-acétate d'ammonium 0,1 M ; 60%-40%). Grâce à un système de double détection UV/radioactivité (détecteur de radioactivité Bioscan 3200, détecteur UV Vis Gilson (absorbance à 254 nm)), le pic radioactif correspondant au [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE est collecté et passé sur SepPack (C18, Waters), puis élué dans l'éthanol absolu pour éliminer le solvant. Un échantillon est analysé en CLHP en phase inverse (colonne analytique C18 4,1 x 250 mm PRP1, Cluzeau), à débit constant de 1,5  $\text{mL} / \text{minute}$  (acétonitrile - acétate d'ammonium 0,1 M 60%-40%) avec co-injection de CLINDE froid (50  $\mu\text{L}$  de solution à 1  $\text{mg}/\text{mL}$ ).



**Figure 23. Radiomarquage du CLINDE à l'iode 125 : réaction d'iododéstannylation par substitution électrophile utilisant l'acide peracétique comme oxydant.**

## B. Résultats

Le [<sup>125</sup>I]-CLINDE a été radiomarqué par substitution électrophile en faisant agir Na[<sup>125</sup>I] sur le précurseur stannique, en présence d'acide peracétique comme agent oxydant, à température ambiante. Après purification par CLHP en phase inverse (temps de rétention de 15 minutes dans les conditions expérimentales utilisées, signal UV nul lors de la collecte du pic radioactif de [<sup>125</sup>I]-CLINDE, assurant une bonne pureté chimique du produit), et passage sur SepPack C18, le produit radiomarqué a été obtenu avec des rendements de marquage compris entre 71 et 88%, une activité spécifique d'environ 80 GBq/μmol et une pureté radiochimique supérieure à 95% (contrôle par co-injection avec le CLINDE froid) (Figure 24).



**Figure 24. Purification du  $[^{125}\text{I}]$ -CLINDE par CLHP : (colonne C18 10 x 250 mm, Phenomenex ; débit constant de 4 mL/minute (acétonitrile - acétate d'ammonium 0,1 M 60%-40%)) (haut). Coinjection du composé radiomarqué avec du CLINDE froid (50  $\mu\text{L}$  de solution à 1 mg/mL, colonne analytique C18 4,1 x 250 mm PRP1, Cluzeau ; débit constant de 1,5 mL/minute (acétonitrile - acétate d'ammonium 0,1 M 60%-40%)) (bas).**

### C. Discussion

Le [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE a été radiomarké par substitution électrophile aromatique régiospécifique avec une reproductibilité dans le rendement de marquage et la pureté radiochimique autorisant son utilisation pour les expérimentations décrites par la suite. Les rendements de marquages, compris entre 71 et 88%, sont équivalents à ceux publiés par nos collaborateurs australiens (Katsifis et al 2000a).

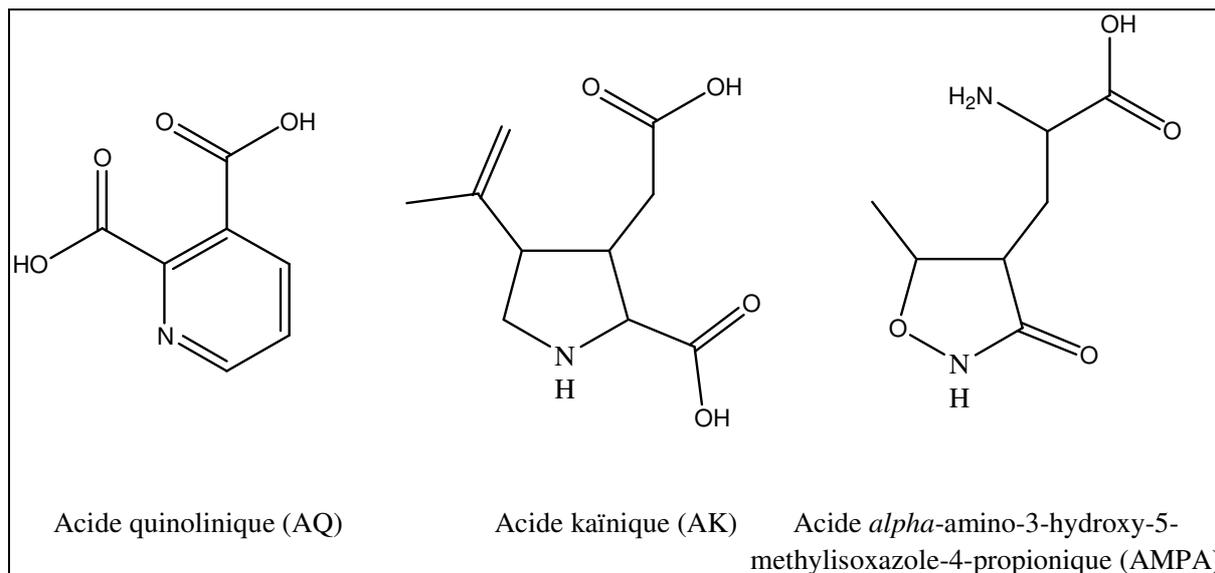
Cette réaction de substitution électrophile sur un précurseur aromatique activé a lieu dans des conditions de marquage « douces » (température ambiante en solvant aqueux). Il s'agit d'un marquage à l'iode par voie directe, l'atome d'iode étant fixé directement par liaison covalente sur le vecteur d'intérêt biologique. L'iode 125 étant fourni sous forme d'iodure de sodium (NaI), les ions iodures doivent être oxydés avant le marquage (Bourdoiseau 1986). Nous avons utilisé l'acide peracétique car les résultats d'une étude comparant les rendements de marquage du CLINDE obtenus avec 3 oxydants, la chloramine T, l'iodogène, et l'acide peracétique, sont largement en faveur de ce dernier (Katsifis et al 2000a).

Du fait de son faible encombrement stérique, la fixation d'un atome d'iode sur un composé organique modifie peu la structure de la molécule. L'iode est donc un radionucléide particulièrement adapté à l'imagerie moléculaire utilisant comme vecteur des ligands de transporteur ou de récepteur dont la structure tridimensionnelle doit être conservée. Par ailleurs, l'iode acquiert un caractère hydrophobe en phase aqueuse, participant ainsi à la lipophilicité du radioligand ce qui facilite son passage de la BHE.

### III. Modèle animal de lésion excitotoxique

#### A. Physiopathologie du modèle choisi

L'injection intracérébrale d'excitotoxines agonistes du glutamate, comme l'acide quinolinique (AQ), l'acide kaïnique (AK) ou l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique (AMPA) (Figure 25), provoque une suractivation des récepteurs au glutamate. Le sous-type de récepteur concerné est fonction de la substance administrée. Par exemple, l'AQ se lie au sous-type N-méthyl-D-aspartate (NMDA), alors que l'AK active le récepteur kaïnate, un récepteur non-NMDA. Il en résulte, entre autres perturbations de l'homéostasie neuronale, une accumulation massive de calcium extracellulaire. Cette concentration élevée en calcium, qui agit comme un second messager, déclenche dans le cytoplasme une cascade d'activations enzymatiques impliquant des enzymes protéolytiques, la phospholipase A2 et la cyclooxygénase, et a un effet délétère par excitotoxicité cellulaire irréversible (Beal et al 1986; Bjorklund et al 1986; Block & Schwarz 1994; Topper et al 1993). Cette mort neuronale s'accompagne de l'activation des cellules de la microglie et de la surexpression de la TSPO, localisée à la lésion, alors que sa concentration dans le reste du cerveau reste indétectable. Par conséquent, la lésion excitotoxique apparaît comme un modèle animal performant pour l'évaluation de radioligands de la TSPO, permettant la détermination d'un rapport signal spécifique / bruit de fond. Néanmoins, ce modèle a pour inconvénient d'entraîner une rupture de la BHE lors de l'injection, de qui peut influencer la distribution cérébrale du traceur. Cependant, cette rupture de la BHE est réversible et son intégrité est restaurée dans les jours suivant la chirurgie (Bolton & Perry 1998), alors que l'activation microgliale est encore présente dans la lésion.



**Figure 25. Exemples d'excitotoxines agonistes du glutamate administrées par voie intracérébrale pour induire une destruction neuronale par excitotoxicité.**

Plusieurs publications étudiant la neuroinflammation à l'aide de radioligands de la TSPO utilisent un modèle de lésion excitotoxique chez le rongeur, que ce soit avec l'AQ (Belloli et al 2004; Moresco et al 2008), l'AK (Yanamoto et al 2007), ou l'AMPA (Boutin et al 2007a; Boutin et al 2007b; Chauveau et al 2009).

Nous avons travaillé sur le modèle de lésion intrastriale à l'acide quinolinique (AQ) chez le rat. L'AQ est une excitotoxine endogène formée dans de nombreux tissus, dont le foie et le cerveau, comme un intermédiaire métabolique de la dégradation du tryptophane (Stone 2001). Administrée par voie intrastriale chez le rat et le primate, elle induit une lésion se rapprochant de la neurodégénérescence observée dans la chorée de Huntington (Guidetti et al 2004). La chorée de Huntington est une maladie chronique héréditaire à transmission autosomique dominante associant des mouvements choréiques (mouvements uni- ou bilatéraux anormaux involontaires spontanés, brusques et brefs, irréguliers et de grande amplitude) et des troubles psychiques (détérioration intellectuelle pouvant aller jusqu'à la

démence). Les symptômes apparaissent le plus souvent entre 30 et 40 ans, et la survie moyenne est comprise entre 10 et 20 ans après le diagnostic (Walker 2007). Des études réalisées sur des cerveaux de patients atteints par la chorée de Huntington ont révélé une destruction sélective des neurones GABAergiques exprimant le récepteur au glutamate du sous-type NMDA par un processus excitotoxique (Young et al 1988), dont les caractéristiques anatomopathologiques ressemblent à celles observées lors d'une injection intrastriatale d'AQ (Beal et al 1991; Schwarcz et al 1983).

## **B. Matériels et Méthodes**

### ***1. Animaux***

Cette étude a été conduite dans le respect de la législation française et des directives européennes en matière d'éthique en expérimentation animale. Des rats mâles de souche Wistar (Centre d'élevage René Janvier, Le Genest St Isle, France) pesant  $338 \pm 9$  g au moment de la lésion ont été utilisés pour ce travail. Les animaux ont été maintenus à l'animalerie à température ( $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) et humidité ( $43 \pm 8\%$ ) constantes avec un cycle nyctéméral d'alternance jour / nuit de 12 heures, avec nourriture et eau ad libitum. Une phase d'acclimatation minimale de 3 jours a été observée entre le jour d'arrivée des animaux et le début de l'expérimentation. Un total de 56 animaux a été nécessaire aux expériences décrites ci-dessous.

### ***2. Lésions à l'AQ***

L'injection d'AQ (Sigma) se déroule sous anesthésie à l'isoflurane (AErrane, Baxter, France), 4% pour l'induction de l'anesthésie, puis 2% pour son maintien. Les animaux sont

placés dans un appareil stéréotaxique de type David Kopf (barre d'incisive réglée à -3,3 mm). La température corporelle de l'animal ( $36,9 \pm 0,6^\circ\text{C}$ ) est contrôlée pendant la chirurgie à l'aide d'une sonde rectale. Après incision de la peau, le crâne est percé et une canule de 30 Gauges (Hamilton) est introduite dans le striatum droit aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : Antéropostériorité : + 0,7 mm ; Latéralité : - 3 mm ; Profondeur : - 5,5 mm, par rapport au bregma (Paxinos & Watson 1986). Un volume de 2  $\mu\text{L}$  de solution de tampon phosphate 0,1 M (pH = 7,4) contenant différentes doses d'AQ (75, 150, ou 300 nmol) est alors injecté à un débit de 0,5  $\mu\text{L}$  / minute ; après l'injection, la canule est maintenue dans la même position pendant 4 minutes supplémentaires puis retirée lentement pour éviter tout reflux. La brèche osseuse est comblée avec de la cire de Horsley, la plaie est ensuite suturée, et le rat remis dans sa cage, sous surveillance quotidienne jusqu'à son sacrifice.

### ***3. Etude de la biodistribution cérébrale ex vivo du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE et compétition avec le PK11195***

Pour chaque dose d'AQ (75, 150, ou 300 nmol) l'étude de la biodistribution cérébrale du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE a été réalisée 6 jours après la chirurgie. Les rats ont reçu une injection intraveineuse (veine péniennne) de 0,37 MBq de [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE dans 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,9 % avec (groupes pré-injectés, n = 5-6) ou sans (groupes témoins, n = 5-6) pré-injection de PK11195 (5 mg/kg, Sigma), dans 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,9%, 15 minutes avant le radioligand. Les animaux ont été sacrifiés 30 minutes après l'injection de [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE. Plusieurs régions cérébrales ont été prélevées et pesées : striatum droit et gauche, cortex droit et gauche, hippocampe droit et gauche, et cervelet. Leur radioactivité respective a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Cobra 5010, Packard) et traduite en pourcentage de la dose injectée

par gramme de tissu en la comparant à celle de dilutions réalisées à partir d'échantillons aliquotes de la solution injectée de [<sup>125</sup>I]-CLINDE et normalisée pour un rat de 350 g.

#### **4. Autoradiographies *ex vivo* au [<sup>125</sup>I]-CLINDE**

Les expériences d'autoradiographie *ex vivo* ont été menées pour illustrer la distribution cérébrale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE. Les résultats présentés sont uniquement qualitatifs. Deux rats ayant reçu une injection intrastriatale de 300 nmol AQ ont été injectés (veine péniennne) 6 jours post-chirurgie avec 1,5 MBq de [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans 300 µL de NaCl 0,9 % avec (rat pré-injecté) ou sans (rat contrôle) pré-traitement au PK11195 (5 mg/kg dans 300 µL de NaCl 0,9%), 15 minutes avant le radioligand. Les animaux ont été sacrifiés 30 minutes après l'injection de [<sup>125</sup>I]-CLINDE, le cerveau a rapidement été prélevé et congelé à -80°C. Des coupes coronales de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau du striatum, de l'hippocampe et du cervelet, avec un microtome cryostat (Jung CM 3000, Leica) à -20°C et montées sur des lames de microscope (Superfrost, Menzel Glaser). Les coupes ont été exposées sur des films sensibles aux rayonnements gamma (Biomax MR, Kodak) dans une chambre noire pendant 6 semaines, puis les films ont été révélés (révélateur Kodak L24), fixés (fixateur Kodak 3000), et séchés. Les images obtenues ont ensuite été scannées (Scanner Epson Perfection 4870 Photo) et analysées (Logiciel βvision + films, Biospace).

#### **5. Autoradiographies *in vitro* au [<sup>3</sup>H]-PK11195**

Chez des animaux lésés comme décrit ci-dessus, la densité en TSPO a été mesurée par autoradiographie *in vitro* au [<sup>3</sup>H]-PK11195 (activité spécifique 3,14 GBq/µmol, Perkin Elmer). Quinze rats Wistar mâles (5 par dose d'AQ) ont été opérés comme décrit précédemment, sacrifiés à 6 jours post-chirurgie, et leur cerveau congelé à -80°C. Des coupes

coronales de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau du striatum et montées sur des lames de microscope (Superfrost, Menzel Glaser). Les coupes ont été incubées pendant 30 min à température ambiante dans un tampon Tris (pH = 7,4) contenant 1 nM de [<sup>3</sup>H]-PK11195. La fixation non-spécifique du [<sup>3</sup>H]-PK11195 a été estimée en incubant de la même façon des coupes adjacentes en présence d'un excès (1 µM) de PK11195 froid. Les coupes ont ensuite été rincées à 2 reprises dans un tampon phosphate (0,1 M) à 4°C, plongées quelques secondes dans l'eau distillée, et séchées à température ambiante. Les coupes ont été exposées pendant 8 semaines avec des gammes étalon de tritium (<sup>3</sup>H-microscales, Amersham), puis les films ont été révélés, fixés et séchés comme décrit précédemment. Les autoradiogrammes obtenus ont ensuite été scannés (Scanner Epson Perfection 4870 Photo) et analysés (Logiciel βvision + films, Biospace).

Pour chaque animal, nous avons utilisé l'hyperfixation du [<sup>3</sup>H]-PK11195, identifiée visuellement, pour délimiter une région d'intérêt (ROI-1) dans le striatum ipsilatéral à la lésion excitotoxique ; la ROI contrôle a été choisie symétriquement dans le striatum controlatéral, non lésé (ROI-2). Le ratio de fixation spécifique du [<sup>3</sup>H]-PK11195 *in vitro*, défini comme [(mesure ROI-1 (Bq/mg) - mesure ROI-2 (Bq/mg)) / mesure ROI-2 (Bq/mg)], a été calculé après soustraction du bruit de fond non spécifique. Au moins 5 coupes striatales par animal ont été utilisées pour la quantification.

## **6. Immunohistochimie**

Les cellules microgliales expriment spécifiquement sur leur membrane plasmique le récepteur de la fraction C3 du complément (CR-3; complexe CD11b/CD18). Nous avons donc utilisé l'anticorps monoclonal OX-42 reconnaissant chez le rat l'antigène CD11b (Robinson et al 1986) pour étudier la relation entre le degré d'excitotoxicité induit par l'AQ et l'intensité de

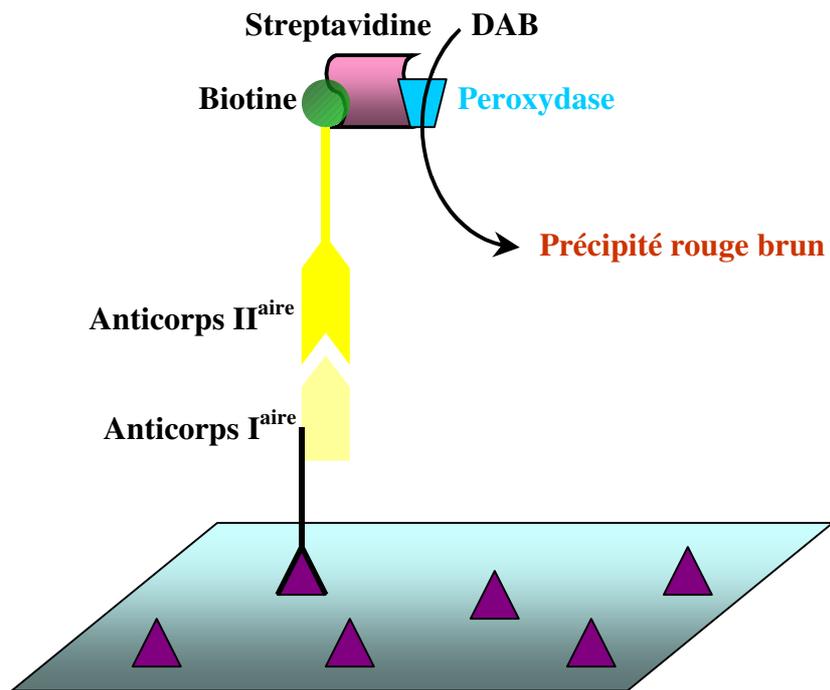
l'activation microgliale par immunohistochimie sur lames. Douze rats Wistar mâles (4 par dose d'AQ) ont été utilisés.

### *6.1 Préparation des cerveaux par perfusion intracardiaque*

Six jours après l'injection intrastriatale d'AQ, les rats sont anesthésiés (pentobarbital, 75 mg/kg, i.p.). La cage thoracique a été ouverte et les tissus ont été fixés par une perfusion intracardiaque de 120 mL de NaCl 0,9 % suivie de 120 mL de paraformaldéhyde (PFA) 4%. Les cerveaux ont ensuite été rapidement prélevés sur de la glace et post-fixés pendant 24 heures dans du PFA 4%, à 4°C, avant d'être congelés à -80°C. Des coupes coronales de 20 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées dans le striatum à l'aide d'un microtome cryostat (Jung CM 3000, Leica) à -20°C, et montées sur des lames Superfrost/Plus. Ces dernières ont été stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

### *6.2 Principe de l'immunohistochimie*

La détection immunohistochimique est basée sur la reconnaissance *in situ* d'une protéine par une réaction immunologique spécifique. Le tissu est incubé dans un premier temps avec un anticorps primaire, produit chez une espèce animale X, qui reconnaît spécifiquement la molécule étudiée. Le complexe antigène-anticorps primaire formé est reconnu par un anticorps secondaire, fabriqué chez une espèce animale Y et dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce X. Le complexe formé est mis en évidence directement à l'aide d'un marqueur fixé sur l'anticorps secondaire. Ce marqueur peut être une substance fluorescente, une molécule radioactive ou encore une enzyme dont la détection est réalisée à l'aide d'un substrat dont le produit de réaction forme un précipité insoluble (Figure 26).



**Figure 26. Principe de détection immunohistochimique de la microglie activée à l'aide de l'anticorps primaire OX-42 dirigé contre le C3, exprimé spécifiquement à la surface des cellules microgliales à l'état activé.**

### *6.3 Caractérisation immunohistochimique de la microglie activée*

Les coupes de striatum des rats lésés sont remises à température ambiante et sont fixées au PFA 4% pendant 15 minutes. Après saturation des peroxydases endogènes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (110 volumes 0,5% dans l'éthanol absolu), les coupes sont pré-incubées 30 minutes avec du sérum de chèvre (Sigma) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du PBS 0,1 M - Gélatine 2% afin de saturer les sites antigéniques non spécifiques. Elles sont ensuite incubées 3 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire OX-42 produit chez la souris (1/1000<sup>ème</sup>, Serotec). Les coupes sont lavées 3 fois 5 minutes (PBS 0,1M – Tween 0,1% - Gélatine 2% puis PBS 0,1M – Tween 0,1%, puis PBS 0,1M). Le complexe antigène-anticorps formé est ensuite reconnu

par un anticorps secondaire biotinylé de lapin anti-immunoglobuline de souris, dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du PBS 0,1M - Gélatine 2%, incubation de 30 minutes à température ambiante. Les coupes sont à nouveau lavées 3 fois 5 minutes (PBS 0,1M – Tween 0,1% - Gélatine 2% puis PBS 0,1M – Tween 0,1%, puis PBS 0,1M) et incubées avec le complexe ABC (streptavidine – peroxydase) durant 30 minutes à température ambiante puis la révélation est effectuée au DAB. Après lavage au PBS 0,1M, les coupes sont déshydratées dans des bains d'éthanol à concentration croissante (60%, 80%, 95% et 100%) puis fixées dans l'Histoclear. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle.

L'activation microgliale a été mesurée par densitométrie semi-quantitative. Les coupes ont été numérisées (module Sony XC77CE couplé à un objectif AF MicroNikkor 60 mm, Nikon), et la densité optique de l'immunoréactivité OX-42 visualisée par le DAB a été mesurée à l'aide du logiciel de traitement de l'image Histolab. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la densité optique dans le striatum lésé par rapport au côté controlatéral à la lésion. Au moins 4 coupes striatales par animal ont été utilisées pour la quantification.

## ***7. Traitement statistique des données***

Le traitement statistique des données a été effectué à l'aide du logiciel Statview (Abacus concepts Inc., USA). Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (SEM). Dans l'étude de biodistribution cérébrale *ex vivo*, un test *t* de Student pour valeurs non appariées a été utilisé pour analyser l'effet du PK11195 froid chez les animaux pré-injectés par rapport aux témoins. Un test *t* de Student pour valeurs appariées a été utilisé pour comparer le côté ipsilatéral (lésé), au côté controlatéral (intact). Pour l'autoradiographie *in vitro* et l'immunohistochimie, les comparaisons statistiques ont été réalisées avec le test

non paramétrique de Kruskal-Wallis. Le seuil de significativité a été fixé pour un risque statistique de premier ordre  $p < 0,05$ .

## **C. Résultats**

### ***1. Etude de la biodistribution cérébrale et autoradiographie ex vivo au [<sup>125</sup>I]-CLINDE, compétition avec le PK11195***

La biodistribution cérébrale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE chez les rats lésés avec différentes doses d'AQ est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (% DI/g tissu), comme indiqué dans la Figure 27A.

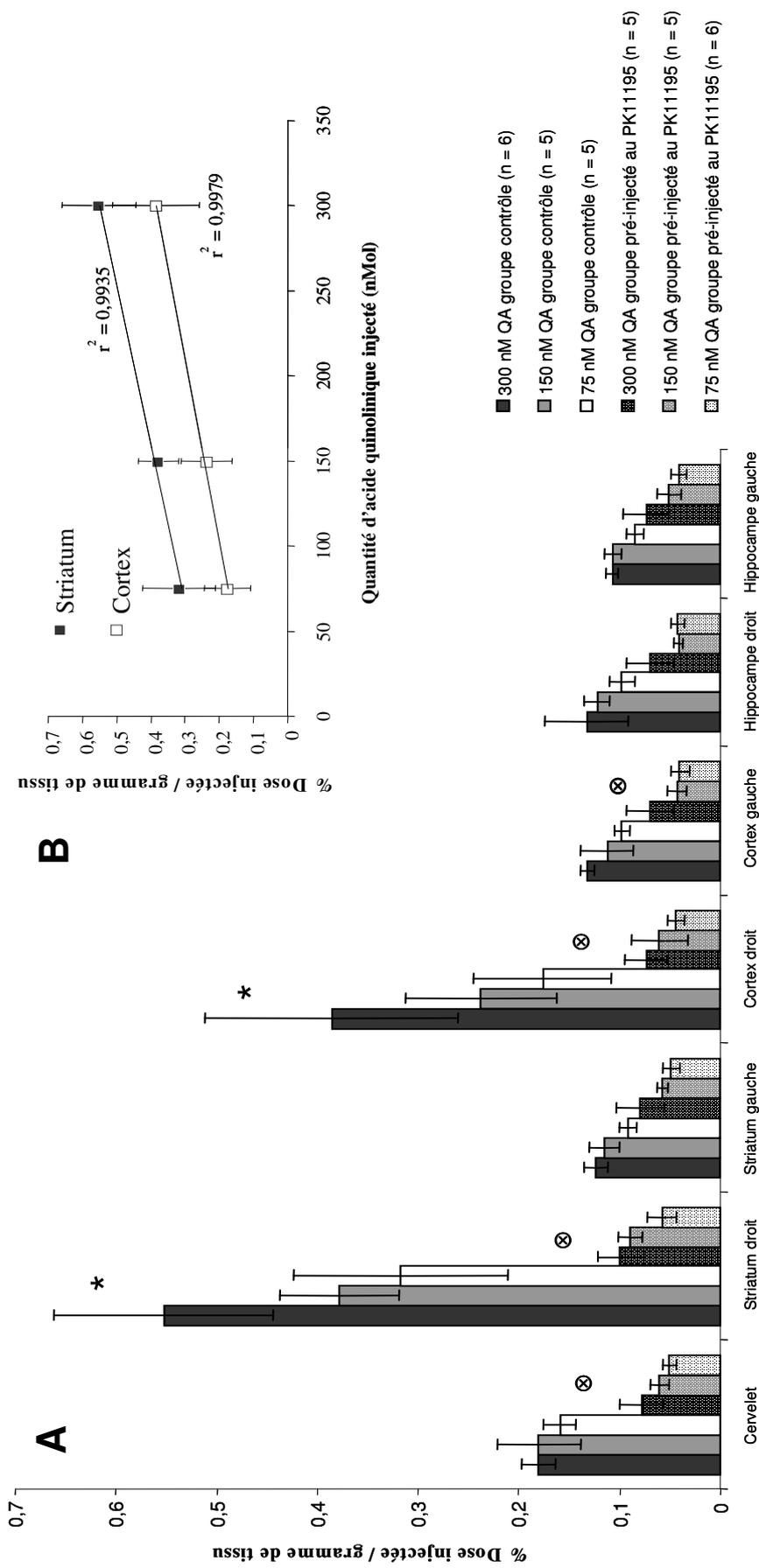


Figure 27. (A) biodistribution cérébrale *ex vivo* du [<sup>125</sup>I]CLINDE (% dose injectée / gramme de tissu) 30 minutes post injection *i.v.*, et effet du pré-traitement au PK11195 (5 mg/kg) sur la fixation cérébrale du [<sup>125</sup>I]CLINDE chez des rats Wistar mâles lésés avec différentes doses d'AQ (75, 150, ou 300 nmol) dans le striatum droit.

\* $p < 0,001$  entre le côté lésé et le côté intact, test *t* de Student pour valeurs appariées.

⊗  $p < 0,001$  entre les rats pré-injectés au PK11195 et les rats contrôle, test *t* de Student pour valeurs non appariées.

(B) Relation entre la quantité d'AQ injecté dans le striatum droit et l'intensité de fixation du [<sup>125</sup>I]CLINDE dans le striatum et le cortex ipsilatéraux.

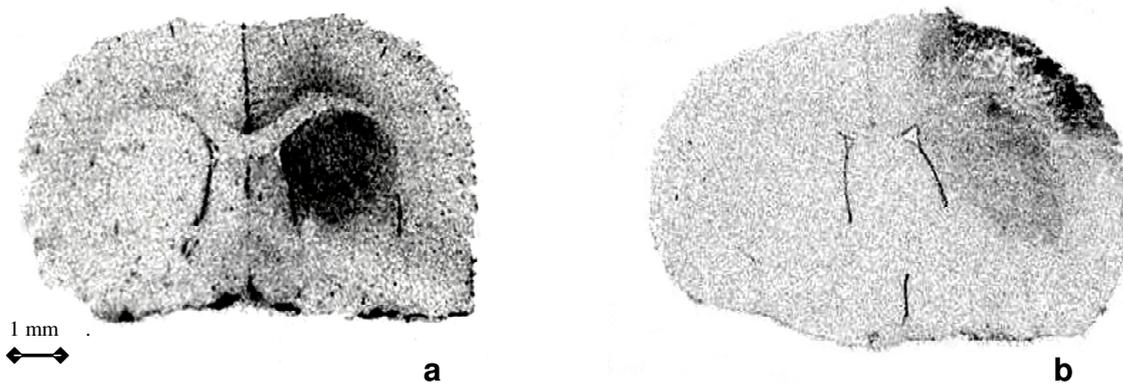
Dans les groupes témoins (sans pré-traitement au PK11195), l'accumulation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans le côté gauche (non lésé) du cerveau est faible (de 0,084 ± 0,008 à 0,180 ± 0,017 % DI/g tissu) et constante quelles que soient la structure cérébrale considérée (cervelet, striatum, cortex, hippocampe), et la dose d'AQ injectée, avec aucune différence significative entre les groupes. Du côté droit (lésé), une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la fixation *in vivo* du [<sup>125</sup>I]-CLINDE est observée dans le striatum pour chaque dose d'AQ (300 nmol : 0,552 ± 0,109 % DI/g tissu, soit +349 % comparé au côté controlatéral ; 150 nmol : 0,378 ± 0,059 % DI/g tissu, soit +229 % ; 75 nmol : 0,317 ± 0,106 % DI/g tissu, soit +248 %).

Une augmentation statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) est également constatée dans le cortex ipsilatéral pour chaque dose d'AQ (300 nmol : 0,385 ± 0,126 % DI/g tissu, soit +194 % comparé au côté controlatéral ; 150 nmol : 0,237 ± 0,075 % DI/g tissu, soit +112 % ; 75 nmol : 0,176 ± 0,068 % DI/g tissu, soit +81 %). Dans l'hippocampe, une faible augmentation de la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE non statistiquement significative a été mesurée du côté lésé par rapport au côté intact pour chaque dose d'AQ.

Les résultats du pré-traitement au PK11195 (5 mg/kg) sur la biodistribution cérébrale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE sont également présentés dans la Figure 27A. Nous observons une réduction de la fixation dans tout le cerveau, la diminution la plus significative étant mesurée dans le striatum et le cortex ipsilatéraux (82 % et 81 %, respectivement, dans le groupe de rats lésés avec 300 nmol d'AQ). La fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE est également réduite chez les rats lésés avec 150 et 75 nmol d'AQ, qui montrent le même profil d'inhibition, avec une diminution importante de l'activité mesurée dans le striatum et le cortex ipsilatéraux (- 76 % et - 75 % pour les animaux lésés avec 150 nmol d'AQ, - 82 % et - 75 % pour ceux lésés avec 75 nmol).

La relation entre la dose d'AQ injectée dans le striatum droit et le niveau de radioactivité mesurée est présentée dans la Figure 27B. La fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE augmente avec la quantité d'AQ administrée, que ce soit dans le striatum ou dans le cortex. Une analyse de régression linéaire montre une corrélation significative entre ces 2 paramètres dans le striatum et le cortex ipsilatéraux (striatum :  $r^2 = 0,9935$  ; cortex :  $r^2 = 0,9979$ ).

Les images d'autoradiographie *ex vivo*, illustrant la distribution striatale et corticale de la radioactivité 30 minutes après l'injection de [<sup>125</sup>I]-CLINDE chez des rats lésés avec 300 nmol d'AQ, sont présentées dans la Figure 28.

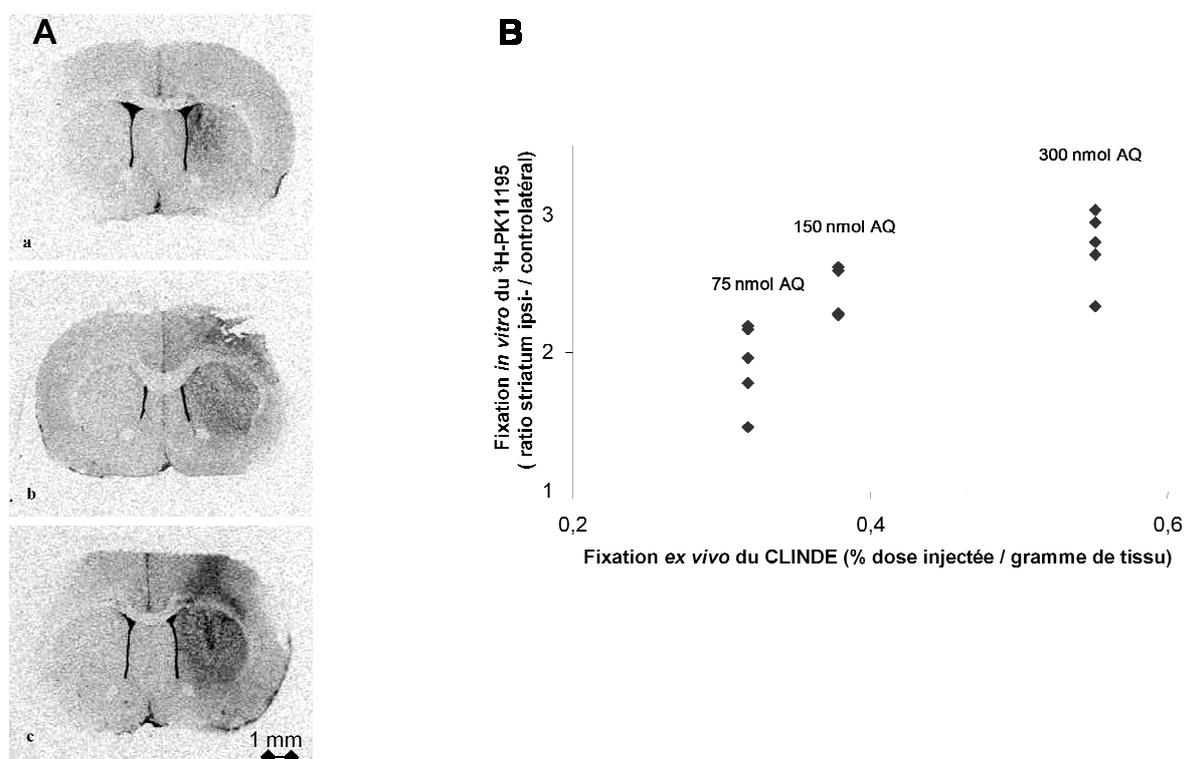


**Figure 28. Images d'autoradiographie *ex vivo* de la distribution du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans le striatum et le cortex. Des coupes frontales de cerveau de rat contrôle (a), et pré-traité au PK11195 (b) sont présentées.**

Les autoradiographies réalisées à partir du rat témoin (Figure 28a) montrent une localisation préférentielle de l'activité dans le striatum ipsilatéral, et à un degré moindre dans le cortex, comparativement au côté controlatéral. Dans l'étude de saturation (Figure 28b), le prétraitement au PK11195 induit une forte diminution de la radioactivité fixée.

## 2. Autoradiographies *in vitro* au [<sup>3</sup>H]-PK11195

Les images d'autoradiographie *in vitro*, illustrant la fixation striatale du [<sup>3</sup>H]-PK11195 en fonction de la quantité d'AQ injectée, sont présentées dans la Figure 29A. La fixation du [<sup>3</sup>H]-PK11195 est faible dans le striatum controlatéral ( $77,5 \pm 17,4$  Bq/mg de tissu), et plus ou moins constante quelle que soit la dose d'AQ utilisée. A contrario, cette fixation spécifique augmente du côté lésé ( $p < 0,001$ ) avec la dose d'AQ :  $224 \pm 13$ ,  $205 \pm 10$ , et  $122 \pm 24$  Bq/mg de tissu pour respectivement 300 (n = 5), 150 (n = 4) et 75 nmol AQ (n = 5).



**Figure 29.** (A) Images d'autoradiographie *in vitro* de la fixation du [<sup>3</sup>H]-PK11195 sur des coupes striatales de cerveaux de rats lésés avec différentes doses d'AQ : 75 (a, n = 5), 150 (b, n = 4) et 300 nmol (c, n = 5). (B) Relation entre la fixation *ex vivo* du [<sup>125</sup>I]-CLINDE et celle du [<sup>3</sup>H]-PK11195 *in vitro* dans le striatum ipsilatéral, rapportée au côté controlatéral, pour chaque dose d'AQ.

Comme le montre la Figure 29B, la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu est corrélée à la fixation spécifique du [<sup>3</sup>H]-PK11195 dans le striatum ipsilatéral rapportée au côté controlatéral, pour chaque dose d'AQ.

### 3. Immunohistochimie

La lésion excitotoxique à l'AQ augmente de façon significative ( $p < 0,001$ ) l'immunoréactivité OX-42, par rapport au côté controlatéral (Figure 30). La mesure semi-quantitative de la densité optique dans le striatum permet d'observer une relation positive entre la dose d'AQ utilisée pour induire le processus excitotoxique et l'immunoréactivité mesurée par un anticorps spécifique de la microglie activée :  $+295 \pm 62\%$ ,  $+239 \pm 36\%$ , et  $+162 \pm 21\%$  pour respectivement 300, 150, et 75 nmol AQ, par rapport au striatum controlatéral.



**Figure 29.** Immunohistochimie OX-42 (anticorps spécifique de la microglie activée) dans le striatum de rats lésés avec différentes quantités d'AQ : 75 (a, n = 2), 150 (b, n = 2) et 300 nmol (c, n = 4).

## IV. Modèles animaux d'ischémie cérébrale

### A. Physiopathologie des modèles choisis

L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue avec les différentes formes de cancer et les maladies cardio-vasculaires l'une des causes majeures de mortalité. Aux États-Unis, selon les dernières statistiques provenant de l'American Heart Association, environ une personne par minute est touchée par cette pathologie et 160 000 patients en décèdent chaque année. En France, on estime à plus de 150 000 le nombre de personnes touchées chaque année par cette pathologie vasculaire cérébrale. Les AVC constituent ainsi l'urgence clinique neurologique la plus fréquente dans les pays industrialisés et entraînent un coût très important en termes de santé publique, estimé à environ 10 000 à 15 000 euros par patient pour 3 mois de prise en charge médicale. Environ un quart des patients décèdent dans les 3 mois suivant l'accident, et environ la moitié dans les 12 mois post-infarctus cérébral. Si un quart des patients récupèrent sans séquelle évidente, les autres sont le plus souvent atteints de déficits neurologiques invalidants pouvant toucher différentes fonctions (motrices, spatio-temporelles, mnésiques, comportementales ou sensorielles) selon la localisation et l'étendue de la région cérébrale touchée. Même si les causes et les conséquences de cette affection semblent bien connues, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant cette pathologie pourrait contribuer efficacement à améliorer la prise en charge des AVC. On regroupe sous le terme d'AVC deux grands types distincts : les AVC de type hémorragique (environ 15% des AVC), consécutifs à la rupture d'un vaisseau cérébral, et les AVC de type ischémique ou infarctus cérébral (environ 85% des AVC) qui résultent de l'obstruction d'un vaisseau cérébral. Les AVC ayant pour cause l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM), ou artère sylvienne, représentent à eux seuls environ la moitié de la totalité des AVC (Bamford et al 1991; Feigin et al 2009). Les modèles animaux d'ischémie cérébrale choisis

pour cette étude sont ceux qui reproduisent au plus juste cette forme d'AVC la plus répandue chez l'homme.

La pénombre est définie comme la région cérébrale entourant le foyer ischémique et est caractérisée par une altération neuronale potentiellement réversible (Ginsberg 2003). Par conséquent, cette zone de pénombre est la cible de nombreux travaux scientifiques destinés à développer et évaluer des traitements neuroprotecteurs. L'étude par imagerie moléculaire utilisant l'autoradiographie *ex vivo* de la réaction neuroinflammatoire associée à l'altération du métabolisme des cellules du parenchyme cérébral pouvant conduire à la mort neuronale dans la pénombre est délicate, de par la difficulté à délimiter précisément des régions d'intérêts en distinguant les tissus constituant le foyer ischémique de la pénombre. De plus, la très grande fragilité à la coupe des tissus atteints par l'ischémie rend difficile toute analyse quantitative de la fixation du radioligand.

La dégénérescence neuronale associée à l'ischémie cérébrale est un processus complexe, évoluant à la fois dans le temps et dans l'espace. En effet, une atteinte des neurones appartenant à des structures cérébrales situées à distance de l'infarctus, et donc indemnes de toute exposition directe à l'ischémie, a été caractérisée et définie il y a plus d'un siècle sous le terme de diaschisis (Von Monakow 1906). Ce diaschisis a également déjà été observé chez des patients par imagerie moléculaire (De Reuck et al 1997; Martin et al 1987). Dans l'ischémie cérébrale focale, ces dommages neuronaux secondaires sont systématiquement observés dans le thalamus et la substance noire, et parfois, selon la procédure utilisée pour induire la lésion, également dans l'hippocampe.

Alors qu'il est aujourd'hui admis que la réaction microgliale est impliquée dans l'altération neuronale suite à une ischémie cérébrale (Danton & Dietrich 2003), la neuroinflammation associée au diaschisis est encore peu étudiée. La caractérisation de ce

phénomène présente pourtant un intérêt indiscutable pour l'évaluation de nouveaux traitements dans la prise en charge de l'AVC, le suivi de la maladie, et la compréhension de sa physiopathologie. Nous avons donc porté notre intérêt sur l'évaluation par autoradiographie *ex vivo* au [<sup>125</sup>I]-CLINDE de la neuroinflammation induite dans le thalamus et la substance noire réticulée dans des modèles d'ischémie cérébrale focale par occlusion de l'ACM.

## **B. Matériels et méthodes**

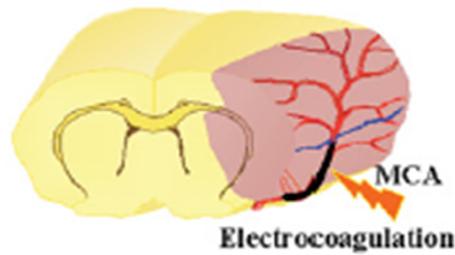
### ***1. Animaux***

Cette étude a été conduite dans le respect de la législation française et des directives européennes en matière d'éthique en expérimentation animale. Des souris mâles, adultes, de souche Swiss et des rats mâles, adultes, de souche Sprague-Dawley (Centre d'élevage René Janvier, Le Genest St Isle, France), pesant respectivement  $37 \pm 1$  g et  $279 \pm 19$  g au moment de la lésion ont été utilisés pour ce travail.

### ***2. Modèle d'occlusion permanente de l'ACM chez la souris***

#### ***2.1 Chirurgie***

Il s'agit d'un modèle non réversible, initialement développé par Tamura (Tamura et al 1981), qui consiste à exposer et électrocoaguler l'ACM après dissection du muscle temporal et craniectomie. L'infarctus induit est très reproductible et délimité au cortex temporo-pariétal (Figure 31).



**Figure 30. Représentation schématique de la technique d'occlusion permanente de l'ACM par électrocoagulation bipolaire (Macrae & Carswell 2006).**

La chirurgie a été réalisée sous anesthésie (isoflurane 1,5-2% (AErrane, Baxter, France) dans un mélange air / oxygène contenant 30% d'O<sub>2</sub>) sur 34 souris Swiss mâles par électrocoagulation bipolaire de l'ACM gauche. Sous microscope, une incision est pratiquée entre l'œil et l'oreille. Le muscle temporal est disséqué ; la partie distale de la MCA est alors visible au travers de l'os crânien translucide. Une craniectomie est ensuite pratiquée à l'aide d'une foreuse dentaire, et la portion distale de l'ACM gauche est coagulée par diathermie bipolaire (Aesculap TB50, Tuttlingen, Allemagne). La température corporelle de l'animal a été mesurée et maintenue à  $37,4 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$  pendant toute la procédure chirurgicale à l'aide d'une couverture chauffante (Harvard, les Ulis, France) connectée à une sonde rectale. Le muscle temporal et les tissus mous sont alors remplacés, l'incision suturée, et l'animal remis dans sa cage, sous surveillance quotidienne.

## 2.2 Autoradiographies *ex vivo* au [<sup>125</sup>I]-CLINDE

Le [<sup>125</sup>I]-CLINDE (1,5 MBq dans 200 µL de NaCl 0,9 %) a été injecté par voie i.v. (veine péniennne) à 3, 8, 15 ou 21 jours après l'occlusion permanente de l'ACM (n = 5-6 par groupe). A 15 jours post-occlusion, la spécificité et la saturabilité de la liaison du [<sup>125</sup>I]-

CLINDE à la TSPO, ainsi que sa sélectivité pour la TSPO par rapport aux CBR ont été étudiées par des expériences de compétition consistant en une pré-injection i.v. de PK11195 (5 mg/kg, Sigma), de CLINDE « froid » (5 mg/kg), ou de flumazénil (4 mg/kg, Roche) dans 200 µL de NaCl 0,9%, 15 minutes avant l'injection en bolus du radioligand (n = 4 par groupe). Les animaux sont sacrifiés par décapitation 30 minutes après l'injection de [<sup>125</sup>I]-CLINDE, le cerveau est prélevé et rapidement congelé à -80°C. Des coupes coronales de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées dans les structures d'intérêt (cortex temporo-pariétal et thalamus) à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau de souris ((Franklin & Paxinos 1997), coordonnées stéréotaxiques : antéropostériorité : + 1,32 à -0,94 mm ; -1,28 à -2,12 mm par rapport au bregma, respectivement) avec un microtome cryostat (Jung CM 3000, Leica) à -20°C puis fixées par adhérence sur des lames de microscope (Superfrost, Menzel Glaser). Des films autoradiographiques Kodak Biomax (Eastman Kodak Company, New York, USA) sensibles aux rayonnements gamma de basse énergie ont été exposés à ces coupes ainsi qu'à des standards étalons d'iode 125 (<sup>125</sup>I-microscales; Amersham) pendant 1 semaine, dans une chambre noire à température ambiante. Les films sont ensuite révélés (révélateur Kodak L24), fixés (fixateur Kodak 3000), et séchés. Les images obtenues sont ensuite numérisées à l'aide d'un scanner (Epson Perfection 4870 Photo) et analysées (Logiciel βvision + films, Biospace).

Des coupes adjacentes à celles prélevées au niveau du cortex temporo-pariétal pour l'autoradiographie ex vivo ont été utilisées pour une caractérisation histologique de la lésion ischémique primaire par coloration au crésyl-violet.

### *2.3 Autoradiographies : analyse et quantification*

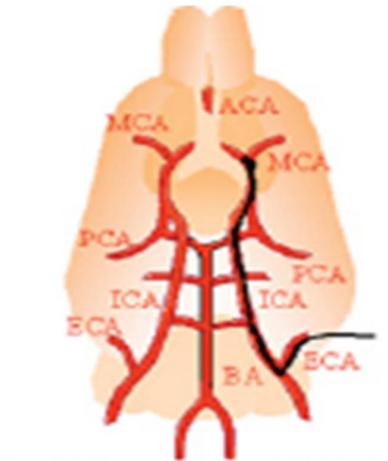
Pour chaque coupe, nous avons utilisé l'hyperfixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE, identifiée visuellement, pour délimiter une région d'intérêt (ROI-1) dans le thalamus ipsilatéral à

l'occlusion de l'ACM ; la ROI contrôle a été choisie symétriquement dans le thalamus controlatéral (ROI-2). Le ratio de fixation (RF) du [<sup>125</sup>I]-CLINDE *ex vivo*, défini comme [(mesure ROI-1(Bq/mg) – mesure ROI-2 (Bq/mg)) / mesure ROI-2 (Bq/mg)], a été calculé après soustraction du bruit de fond non spécifique. Le thalamus a ainsi été entièrement analysé pour chaque animal (soit environ 20 coupes / cerveau), et les sections présentant un RF > 80% ont été retenues (un seuil de 80% a été retenu pour le RF au regard de la sensibilité de la méthode autoradiographique (Watanabe et al 2000)). La surface de la ROI-1 (mm<sup>2</sup>) de ces sections a ensuite été multipliée par le RF associé pour obtenir un indice quantitatif de la fixation thalamique du [<sup>125</sup>I]-CLINDE (mm<sup>2</sup> x RF(%)) pour la section. La fixation totale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans le thalamus a été calculée en considérant chacune des sections retenues, l'épaisseur des coupes et la distance entre la coupe considérée et la coupe suivante. Elle est exprimée en mm<sup>3</sup> x RF(%).

### **3. *Modèle d'occlusion transitoire de l'ACM chez le rat***

#### **3.1 *Chirurgie***

Ce modèle, initialement développé par Koizumi (Koizumi et al 1986), puis modifié par Longa (Longa et al 1989), consiste en l'introduction d'un dispositif occlusif constitué d'un fin fil de nylon épaissi à son extrémité dans la carotide externe et guidé jusqu'à l'origine de l'ACM pour y interrompre le débit sanguin. Ce modèle présente plusieurs avantages : il ne nécessite pas de craniectomie et est facilement réversible pour induire une ischémie focale transitoire, conduisant au développement de gros infarctus impliquant les aires corticales et striatales (Kloss et al 2002; Oliff et al 1995), (Figure 32).



**Figure 31. Représentation schématique de la technique d'occlusion intraluminale transitoire de l'ACM (Longa et al 1989). ACA : anterior cerebral artery ; MCA : middle cerebral artery ; PCA : posterior cerebral artery ; ECA : external cerebral artery ; ICA : internal cerebral artery (Macrae & Carswell 2006).**

La taille de l'infarctus dans ce modèle est très variable ; de nombreux facteurs y contribuent, comme le diamètre du filament (Abraham et al 2002), le débit sanguin dans les vaisseaux collatéraux (Stoll et al 1998), la méthode d'anesthésie (Haelewyn et al 2003), la souche, l'élevage de provenance, l'âge et le poids de l'animal (Oliff et al 1995). Afin d'obtenir une variabilité interindividuelle du volume ischémique encore plus grande, nous avons fait varier la durée de l'occlusion de l'ACM : 30 min (n = 8), ou 90 min (n = 9) (Garcia et al 1997; Memezawa et al 1992).

Par ailleurs, la mortalité observée avec ce modèle n'est pas négligeable à cause de l'important volume de l'infarctus induit et de l'œdème associé. Ce paramètre a nécessité d'augmenter le nombre d'animaux pour notre étude : 22 rats ont été lésés pour une expérimentation finale portant sur un total de 17 animaux, soit une mortalité due à la chirurgie supérieure à 20%, observée essentiellement dans le groupe d'animaux dont l'occlusion a duré 90 min.

La chirurgie a été réalisée sous anesthésie à l'isoflurane ((AErrane, Baxter, France), 2,5% dans un mélange air / oxygène contenant 30% d'O<sub>2</sub>). La température corporelle de l'animal a été régulée (37,5–38°C) pendant toute la procédure chirurgicale à l'aide d'une couverture chauffante (Harvard, les Ulis, France). Une incision longitudinale a été pratiquée au niveau de la trachée. La bifurcation carotidienne (artère carotide commune (ACC), artère carotide externe (ACE) et artère carotide interne (ACI)) a été dégagée d'entre les muscles péri-trachéaux et le muscle sterno-mastoïdien. L'ACC a été clampée par un microclip vasculaire, et l'ACE distale électrocoagulée. Un filament en nylon (diamètre : 0,18mm), équipé à son extrémité distale d'un manchon occlusif en colle thermofusible (longueur : 3mm ; diamètre : 0,38mm) a alors été inséré dans le lumen de l'ACE sectionnée. Le moignon de l'ACE a ensuite été aligné avec l'ACI, permettant au filament d'être poussé dans l'ACI jusqu'à ce que le manchon occlusif du filament se retrouve au niveau de l'origine de l'ACM, interrompant ainsi le débit sanguin dans celle-ci. Le positionnement correct du filament a été validé par la chute du débit sanguin (25%-75%) mesurée par laser doppler. A la fin de l'intervention, des points de suture ont été réalisés pour refermer la peau du cou, et l'anesthésie stoppée. Trente ou 90 minutes plus tard, l'animal a été ré-anesthésié, et, après réouverture des points de suture au niveau du cou, la restauration du débit sanguin dans l'ACM, ou reperfusion, a été obtenue en retirant le filament occlusif. L'incision a été suturée, et l'animal remis dans sa cage. Durant la semaine suivante, il a reçu une injection sous-cutanée de 1 mL de NaCl 0,9% biquotidienne, afin de prévenir une déshydratation post-chirurgicale.

### 3.2 IRM et mesure du volume d'infarctus

Les données d'IRM ont été acquises à 20 jours post-occlusion dans un aimant horizontal de 7T Pharmascan 70/16 (Bruker Biospin) équipé d'une antenne de volume quadrature (diamètre interne 38 mm) pour l'émission/réception. Les rats ont été anesthésiés à l'isoflurane ((AErrane, Baxter, France), 2% dans un mélange air / oxygène contenant 30% d'O<sub>2</sub>), positionnés dans un berceau et maintenus par des barres d'oreille et une barre à dents pour minimiser les mouvements de la tête. La température corporelle de l'animal a été régulée (37,5–38°C) pendant toute la procédure d'acquisition, et la fréquence respiratoire monitorée en continu. Une imagerie de repérage en écho de gradient a tout d'abord été réalisée pour permettre le placement des coupes. Des images pondérées T2 accélérées sont ensuite acquises (séquence RARE avec facteur d'accélération de 8; TE effectif de 65ms; TR 5000ms; 4 accumulations; champ de vue 3,84x3,84 cm<sup>2</sup>; 20 coupes contigües, épaisseur de coupe de 0,75 mm; matrice 256x192 extrapolée à 256x256; temps d'acquisition 8 min).

Le logiciel d'analyse d'images Image J (Rasband, 1997-2006) a été utilisé pour mesurer le volume d'infarctus pour chaque animal. Pour chaque section, une région d'intérêt (ROI) correspondant au tissu corticostriatal infarcté a été délimitée et un volume élémentaire a été obtenu en multipliant la surface de la ROI par la distance de la coupe considérée à la coupe suivante. Le volume d'infarctus (mm<sup>3</sup>) a été calculé pour chaque rat en additionnant les volumes élémentaires. Les volumes thalamiques ipsi- (VTI) et controlatéraux (VTC) à la lésion ont été mesurés et l'atrophie thalamique a été calculée en appliquant la formule : [(VTC – VTI) / VTC].

### 3.3 Autoradiographies *ex vivo* au [<sup>125</sup>I]-CLINDE

Le [<sup>125</sup>I]-CLINDE (3 MBq dans 500 µL de NaCl 0,9 %) a été injecté par voie i.v. (veine pénienne) à 21 jours après l'occlusion transitoire de l'ACM, soit le lendemain des acquisitions IRM. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation 30 minutes après l'injection de [<sup>125</sup>I]-CLINDE, le cerveau prélevé et rapidement congelé à -80°C. Des coupes coronales de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées dans les structures d'intérêt : site de l'infarctus primaire (cortex et striatum), thalamus et substance noire réticulée (SNr), à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau de rat ((Paxinos & Watson 1986), coordonnées stéréotaxiques : antéropostériorité : + 2,20 à -1,30 mm ; -1,80 à -4,30 mm ; -4,52 à -6,30 mm par rapport au bregma, respectivement) avec un microtome cryostat (Jung CM 3000, Leica) à -20°C puis fixées par adhérence sur des lames de microscope (Superfrost, Menzel Glaser). Des films autoradiographiques Kodak Biomax (Eastman Kodak Company, New York, USA) sensibles aux rayonnements gamma de basse énergie ont été exposés à ces coupes ainsi qu'à des standards étalons d'iode 125 (<sup>125</sup>I-microscales; Amersham) pendant 1 semaine, dans une chambre noire à température ambiante. Les films ont ensuite été révélés (révélateur Kodak L24), fixés (fixateur Kodak 3000), et séchés. Les images obtenues ont ensuite été numérisées à l'aide d'un scanner (Epson Perfection 4870 Photo) et analysées (Logiciel βvision + films, Biospace).

### 3.4 Autoradiographies : analyse et quantification

Pour chaque coupe, nous avons utilisé l'hyperfixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE, identifiée visuellement, pour délimiter une région d'intérêt (ROI-1) dans le thalamus et la SNr du côté ipsilatéral à l'occlusion de l'ACM ; la ROI contrôle a été choisie symétriquement dans le thalamus ou la SNr controlatéral (ROI-2). Le ratio de fixation (RF) du [<sup>125</sup>I]-CLINDE *ex vivo*,

défini comme  $[(\text{mesure ROI-1 (Bq/mg)} - \text{mesure ROI-2 (Bq/mg)}) / \text{mesure ROI-2 (Bq/mg)}]$ , a été calculé après soustraction du bruit de fond non spécifique. Le thalamus et la SNr ont ainsi été entièrement analysés pour chaque animal (soit 29 à 42 coupes / structure), et les sections présentant un RF > 80% ont été retenues. La surface de la ROI-1 (mm<sup>2</sup>) de ces sections a ensuite été multipliée par le RF associé pour obtenir un indice quantitatif de la fixation thalamique ou nigrale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE (mm<sup>2</sup> x RF(%)) pour la section. La fixation totale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans le thalamus et la SNr a été calculée en considérant chacune des sections retenues, l'épaisseur des coupes et la distance entre la coupe considérée et la coupe suivante. Elle est exprimée en mm<sup>3</sup> x RF(%).

### 3.5 Immunohistochimie

L'activation microgliale et la dégénérescence neuronale ont été étudiées dans les structures d'intérêt des cerveaux de rats ischémiques par immunohistochimie sur lame. L'anticorps monoclonal OX-42 a été utilisé comme anticorps primaire pour marquer les cellules microgliales et l'anticorps NeuN, marqueur neuronal dirigé contre la protéine nucléaire NeuN (Xu et al 1997), pour marquer les corps cellulaires des neurones.

Du fait de la grande variabilité interindividuelle observée dans le modèle d'ischémie cérébrale choisi, ces expériences ont été menées sur les mêmes animaux que ceux utilisés pour l'autoradiographie, afin de permettre la comparaison des résultats obtenus par les 2 techniques. Deux séries (une par anticorps) de coupes coronales (20 µm d'épaisseur), adjacentes à celles prélevées pour l'autoradiographie *ex vivo* ont donc été utilisées, et par conséquent, les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des cerveaux "non perfusés".

Les coupes ont été remises à température ambiante et fixées au PFA 4% pendant 15 minutes. Après saturation des peroxydases endogènes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (110 volumes 0,5% dans l'éthanol absolu), les coupes ont été pré-incubées 30 minutes avec du sérum de chèvre (Sigma) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du PBS 0,1 M - Gélatine 2% afin de saturer les sites antigéniques non spécifiques. Elles ont ensuite été incubées 3 heures à température ambiante en présence de l'anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt (anticorps primaire), produit chez la souris (OX-42, dilution 1/1000<sup>ème</sup>, Serotec ; NeuN, dilution 1/1000<sup>ème</sup>, Millipore). Deux lames « témoin négatif », incubées en l'absence d'anticorps primaire, ont servi pour le contrôle de la spécificité du marquage immunohistochimique. Les coupes ont été lavées 3 fois 5 minutes (PBS 0,1M – Tween 0,1% - Gélatine 2% puis PBS 0,1M – Tween 0,1%, puis PBS 0,1M) et le complexe antigène-anticorps formé a ensuite été reconnu par un anticorps secondaire biotinylé de lapin anti-immunoglobuline de souris, dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du PBS 0,1M - Gélatine 2%, incubation de 30 minutes à température ambiante. Les coupes ont à nouveau été lavées 3 fois 5 minutes (PBS 0,1M – Tween 0,1% - Gélatine 2% puis PBS 0,1M – Tween 0,1%, puis PBS 0,1M), incubées avec le complexe ABC (streptavidine – peroxydase) durant 30 minutes à température ambiante puis la révélation a été effectuée au 3',3-diaminobenzidine (DAB, Sigma). Après lavage au PBS 0,1M, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'éthanol à concentration croissante (60%, 80%, 95% et 100%) puis fixées dans l'Histoclear. Les coupes ont ensuite été montées entre lame et lamelle, puis numérisées (module Sony XC77CE couplé à un objectif AF MicroNikkor 60 mm, Nikon).

#### **4. Traitement statistique des données**

Le traitement statistique des données a été effectué à l'aide du logiciel Statview (Abacus concepts Inc., USA). Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (SEM).

Dans les travaux réalisés sur le modèle d'occlusion permanente chez la souris, la fixation thalamique du [ $^{125}$ I]-CLINDE dans les différents groupes a été comparée par une analyse de variance à 1 facteur (ANOVA I), où le facteur est l'intervalle de temps entre la lésion et l'injection du traceur pour l'étude cinétique, et le traitement pour l'étude de compétition. Lorsque les résultats de l'ANOVA étaient significatifs, les groupes expérimentaux ont été comparés entre eux par un test post-hoc de comparaison multiple Fisher LSD. Un test  $t$  de Student pour valeurs appariées a été utilisé pour comparer la fixation thalamique du [ $^{125}$ I]-CLINDE entre les côtés ipsi- et controlatéral.

Dans le modèle d'occlusion transitoire chez le rat, les volumes d'infarctus entre les 2 groupes (occlusion de 30 ou 90 min) ont été comparés par un test non paramétrique d'analyse des moyennes de petits échantillons indépendants ou test de Mann et Whitney. Un test  $t$  de Student pour valeurs appariées a été utilisé pour comparer la fixation du [ $^{125}$ I]-CLINDE dans le thalamus et la SNr entre les côtés ipsi- et controlatéral. La relation entre les volumes de l'infarctus dans le cortex et le striatum et le fixation thalamique et nigrale du [ $^{125}$ I]-CLINDE a été étudiée par calcul du coefficient de corrélation de Pearson.

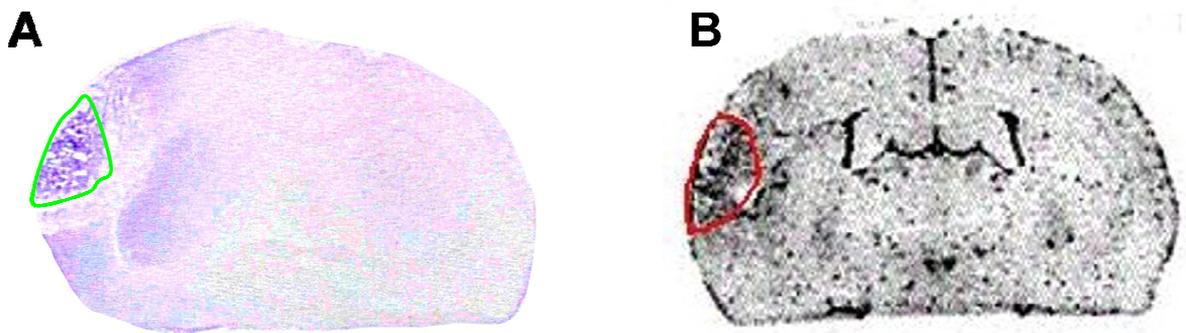
Le seuil de significativité a été fixé pour un risque statistique de premier ordre  $p < 0,05$ .

## C. Résultats

### 1. Modèle d'occlusion permanente de l'ACM chez la souris

#### 1.1 Cinétique de la fixation thalamique du [<sup>125</sup>I]-CLINDE

Suite à l'occlusion permanente de l'ACM, tous les animaux de cette étude ont montré des signes d'ischémie cérébrale à l'analyse histologique des coupes au crésyl-violet. Ces dommages sont limités au cortex temporo-pariétal du territoire de l'ACM. Macroscopiquement, ces zones apparaissent d'une coloration plus marquée par comparaison à leurs homologues controlatéraux, témoignant de la formation d'un œdème cérébral (Figure 33A). Les images d'autoradiographie *ex vivo*, illustrant la distribution de la radioactivité 30 minutes après l'injection de [<sup>125</sup>I]-CLINDE montrent une localisation préférentielle de l'activité dans le cortex temporo-pariétal ipsilatéral (Figure 33B), associée à une excellente corrélation spatiale avec le marquage au crésyl-violet.



**Figure 32.** Ischémie cérébrale focale permanente sur souris Swiss induite par électrocoagulation de l'ACM : images de coloration histologique au crésyl-violet (A) et d'autoradiographie *ex vivo* de la distribution du [<sup>125</sup>I]-CLINDE (B) chez la même souris, 3 jours après l'occlusion.

Une accumulation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE est également détectée dans le thalamus ipsilatéral dès 3 jours post-occlusion ( $p < 0,01$  comparativement au thalamus controlatéral). Son intensité augmente durant les 3 semaines de l'étude (Figure 34A), traduisant une expansion progressive et statistiquement significative de la fixation thalamique du traceur au cours du temps ( $p < 0.05$ , Figure 34B).

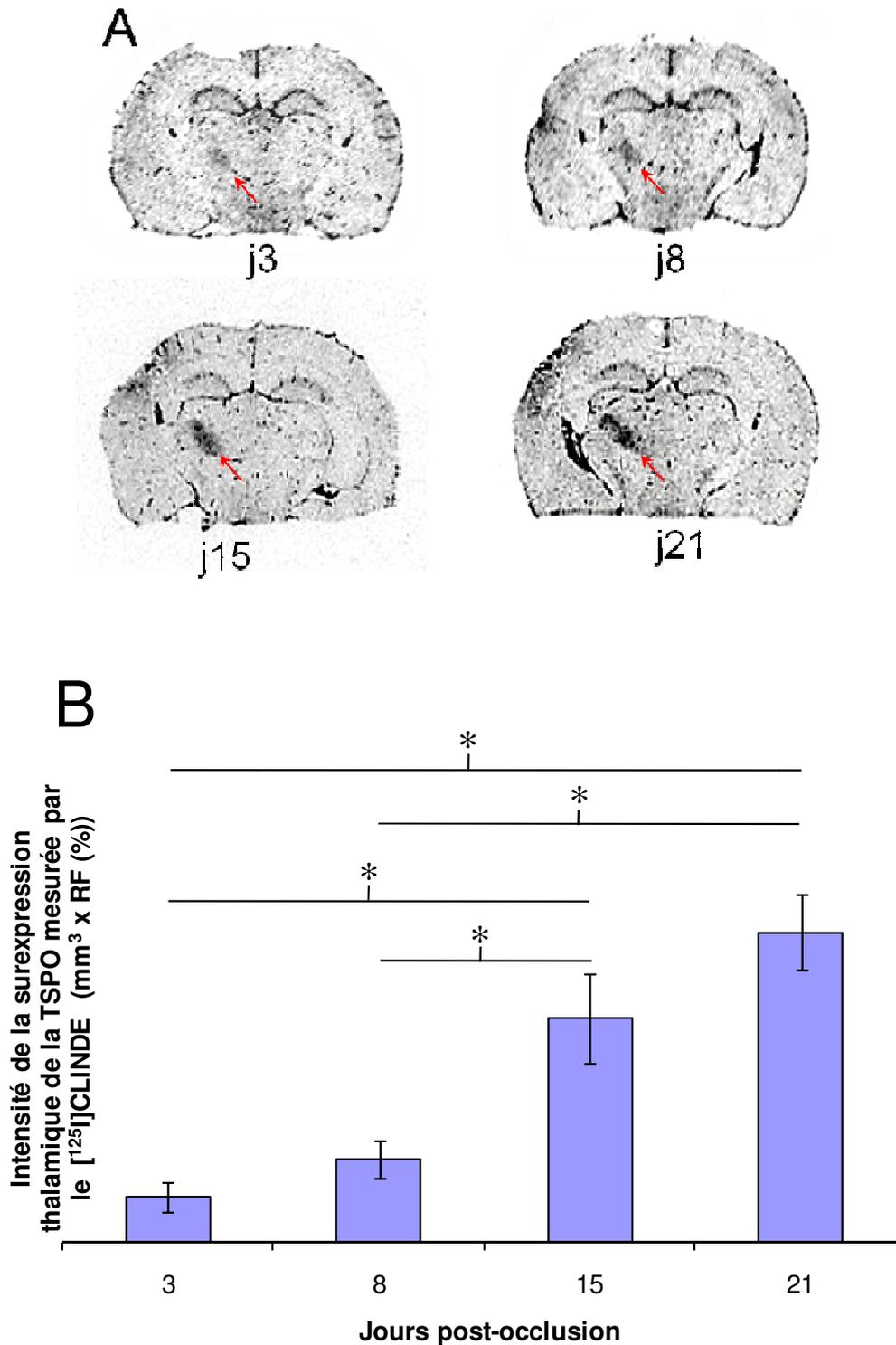


Figure 33. Cinétique de fixation du  $[^{125}\text{I}]\text{-CLINDE}$  dans le thalamus ipsilatéral à l'occlusion permanente de l'ACM. (A) Autoradiographies *ex vivo* illustrant l'accumulation du  $[^{125}\text{I}]\text{-CLINDE}$  : des coupes coronales réalisées au niveau du thalamus de souris soumises à une occlusion de 3, 8, 15, ou 21 jours sont présentées. (B) Evolution de l'intensité de la fixation thalamique du  $[^{125}\text{I}]\text{-CLINDE}$  au cours du temps. (\* :  $p < 0,05$ ,  $n = 5\text{-}6$  / groupe).

## 1.2 Etudes de compétition

Les études de compétition *ex vivo* du [<sup>125</sup>I]-CLINDE avec divers ligands froids ont été menées à 15 jours post-occlusion. Les résultats du prétraitement au PK11195 (5 mg/kg), au CLINDE (5 mg/kg) ou au flumazénil (4 mg/kg) sur la biodistribution cérébrale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE sont illustrés dans la Figure 35A. Nous avons observé une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la fixation thalamique du traceur chez les animaux pré-injectés avec un excès de PK11195 ou de CLINDE, les 2 ligands froids de la TSPO présentant un profil d'inhibition équivalent (PK11195 : -84% ; CLINDE : -81%), alors qu'aucune différence significative n'a été constatée dans le groupe ayant reçu le flumazénil (Figure 35B). Ce résultat suggère fortement que la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans le thalamus, situé à distance de la lésion primaire, mais atteint par le processus de diaschisis dans ce modèle d'ischémie cérébrale, est saturable, spécifique de l'expression de la TSPO, et sélective par rapport aux CBR.

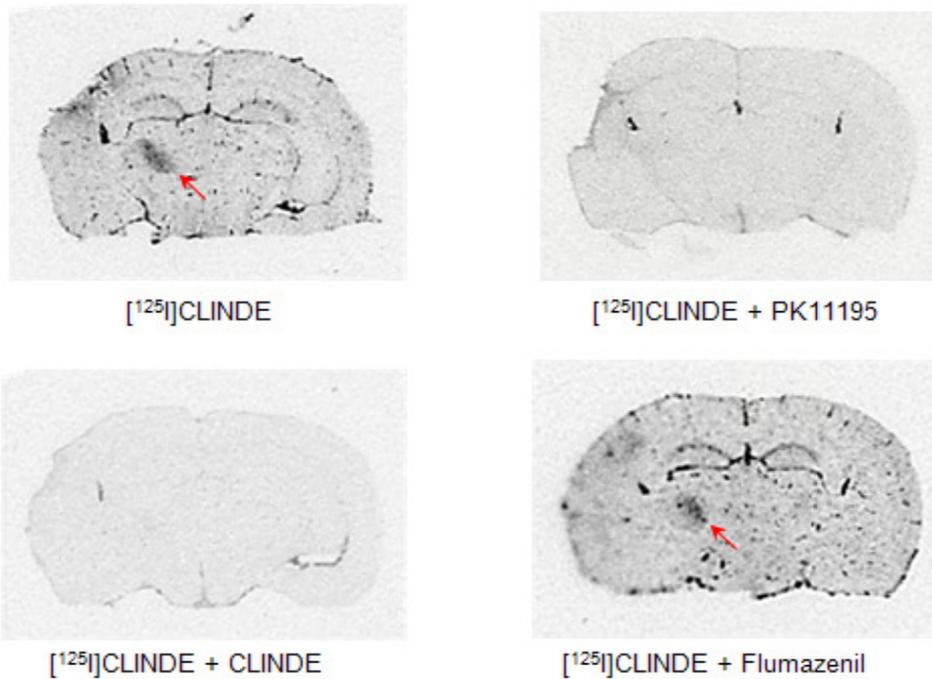
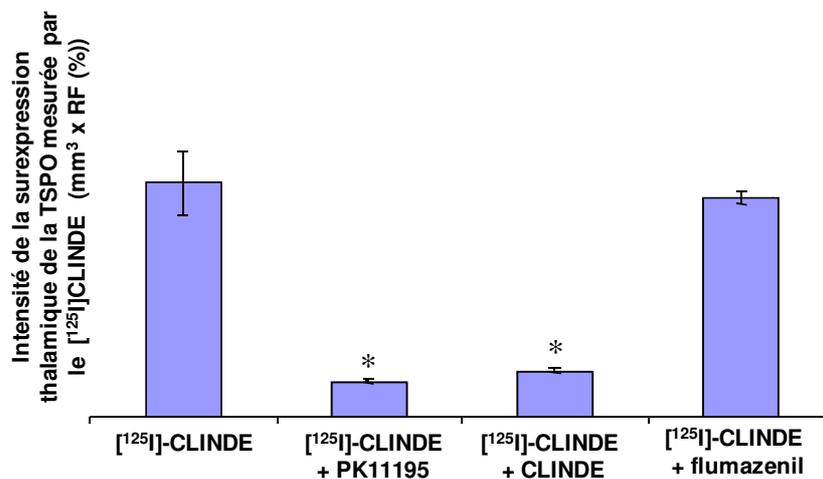
**A****B**

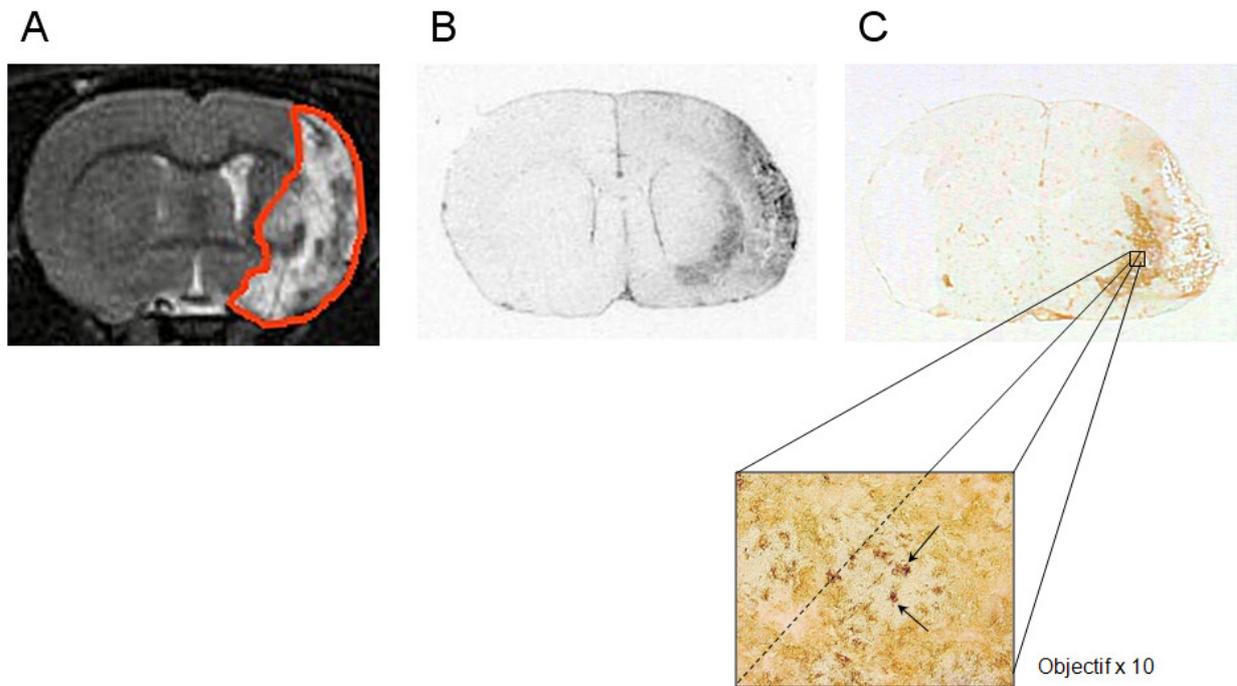
Figure 34. Effets d'un pré-traitement par un excès de PK11195, de CLINDE ou de flumazénil (spécifique des récepteurs centraux aux benzodiazépines) sur la fixation thalamique du [<sup>125</sup>I]-CLINDE chez la souris, 15 jours après l'occlusion de l'ACM. (A) Images d'autoradiographies *ex vivo* de la distribution du [<sup>125</sup>I]-CLINDE réalisées au niveau du thalamus. Des coupes frontales de cerveau contrôle, prétraités au PK11195, au CLINDE ou au flumazénil, sont présentées. (B) Quantification du signal mesuré dans le thalamus ipsilatéral à la lésion montrant une diminution statistiquement significative par rapport au groupe témoins (\* :  $p < 0,001$ ) de la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE après prétraitement au PK11195 ou au CLINDE, mais pas au flumazénil ;  $n = 6$  dans le groupe témoins,  $n = 4$  dans les groupes « prétraitements ».

## 2. *Modèle d'occlusion transitoire de l'ACM chez le rat*

### 2.1 *Fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE au niveau de la lésion primaire*

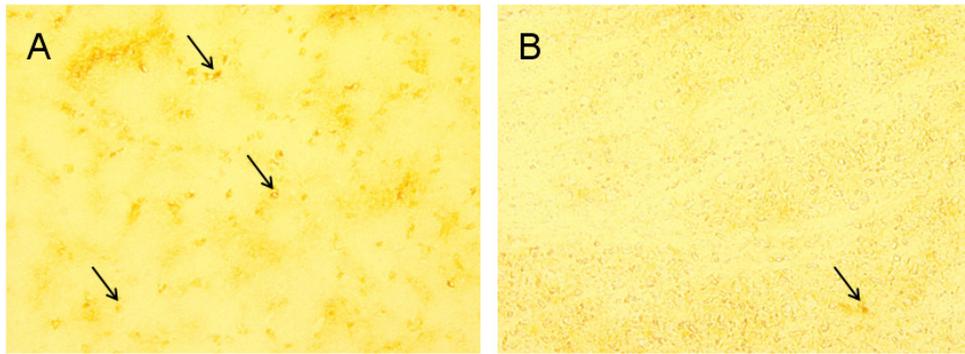
Les images IRM T2 réalisées 20 jours après occlusion transitoire de l'ACM ont mis en évidence un infarctus dans le territoire irrigué par l'ACM, correspondant au cortex et à la partie latérale du striatum. Les résultats obtenus se caractérisent par une hétérogénéité considérable, le volume total de l'infarctus variant de 0 à 340 mm<sup>3</sup> (110±25mm<sup>3</sup>). Du fait de cette variabilité interindividuelle, aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre les animaux soumis à une occlusion de 30 min (73±21mm<sup>3</sup>, n=8), et ceux soumis à une occlusion de 90 min (143±42mm<sup>3</sup>, n=9), p = 0,34.

Une mesure quantitative de la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE au niveau de la lésion ischémique n'a pas pu être effectuée sur les autoradiographies *ex vivo* illustrant la biodistribution cérébrale du traceur 21 jours après la lésion, du fait de la mauvaise qualité des sections réalisées dans le plan corticostriatal, due à l'extrême fragilité des tissus infarcis. Néanmoins, une comparaison qualitative des images autoradiographiques et des IRM T2 a mis en évidence une excellente corrélation spatiale entre la localisation de l'infarctus et l'hyperintensité du signal radioactif, qui colocalise également avec l'expression de la microglie activée, caractérisée par le marquage immunohistochimique anti-CD11b (Figure 36). Les cellules OX-42 positives présentent une forme amiboïde (ronde), avec un corps cellulaire hypertrophié, phénotype caractéristique de la microglie à l'état activé.



**Figure 35.** Images représentatives réalisées dans la lésion primaire corticostriatale après occlusion transitoire de l'ACM de 30 min (rat n°6, volume total d'ischémie = 103 mm<sup>3</sup>) en IRM T2 (A), autoradiographie *ex vivo* ([<sup>125</sup>I]-CLINDE), et marquage immunohistochimique anti-CD11b (OX-42) (C). Les cellules de la microglie activée se caractérisent par leur aspect morphologique amiboïde ; flèche noire.

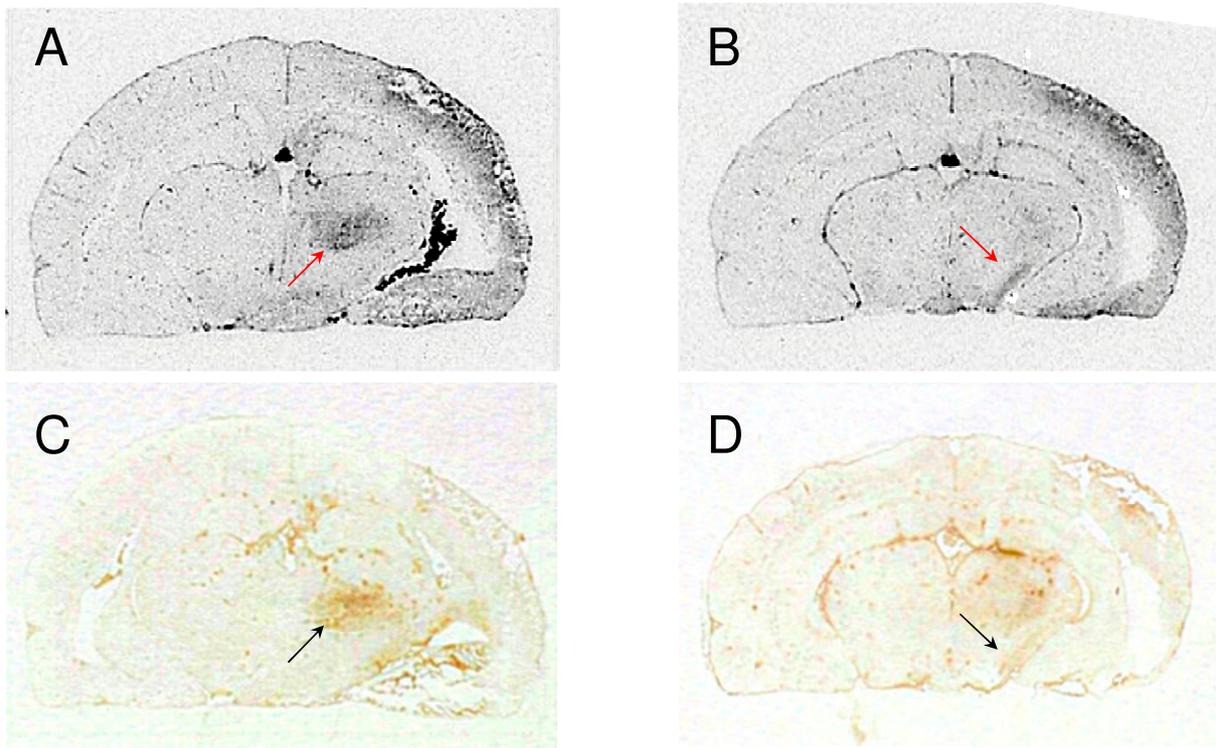
A contrario, l'immunoréactivité anti-NeuN est fortement diminuée dans la région infarctée, comparativement au côté controlatéral, ce qui illustre la perte neuronale engendrée par l'ischémie (Figure 37).



**Figure 36. Marquage immunohistochimique anti-NeuN sur lame. Coupes effectuées dans le plan de la lésion ischémique primaire corticostriatale du côté controlatéral (A) et ipsilatéral (B) à l'occlusion transitoire de l'ACM. Les corps cellulaires des neurones sont repérés à l'aide des flèches noires (objectif x 10).**

*2.2 Fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans les structures cérébrales distantes de la lésion primaire*

Nous avons également mis en évidence une augmentation du signal radioactif dû à la distribution cérébrale du [<sup>125</sup>I]-CLINDE au-delà de l'infarctus induit par l'occlusion de l'ACM, dans le thalamus et la substance noire réticulée (SNr), du côté ipsilatéral à la lésion (Figure 38).



**Figure 37. Autoradiographies *ex vivo* illustrant la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE du côté ipsilatéral à la lésion dans le thalamus (A) et dans la SNr (B) ; flèches rouges. Le signal coïncide avec une augmentation de l'intensité du marquage immunohistochimique anti-CD11b, spécifique de la microglie activée dans le thalamus (C), et dans la SNr (D) ; flèches noires. Images du rat n°8, occlusion transitoire de l'ACM de 90 min, volume total d'ischémie = 248 mm<sup>3</sup>.**

En effet, la quantification du signal radioactif dans le thalamus et la SNr a montré que l'accumulation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans la ROI-1 était significativement supérieure à celle mesurée dans la ROI-2 controlatérale (Tableau V).

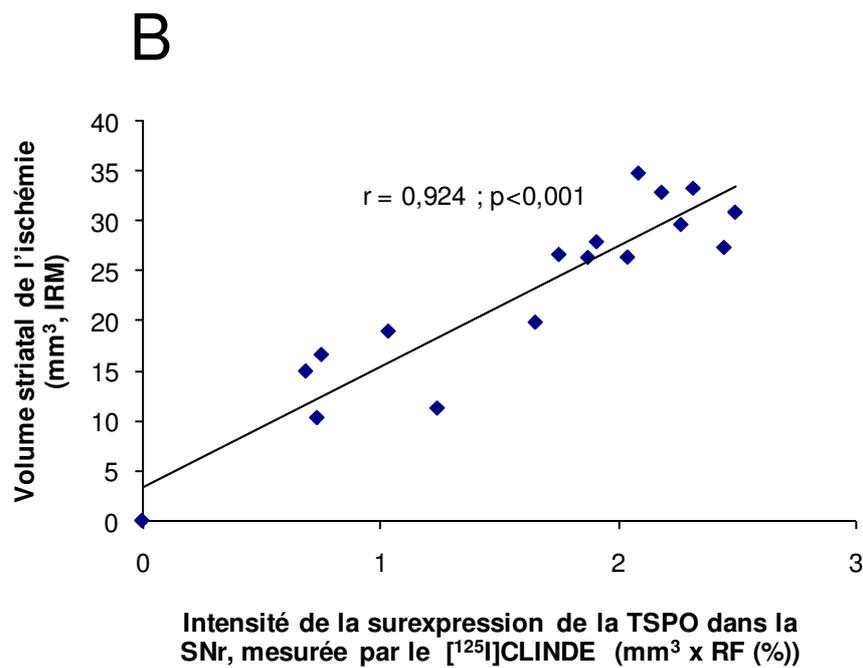
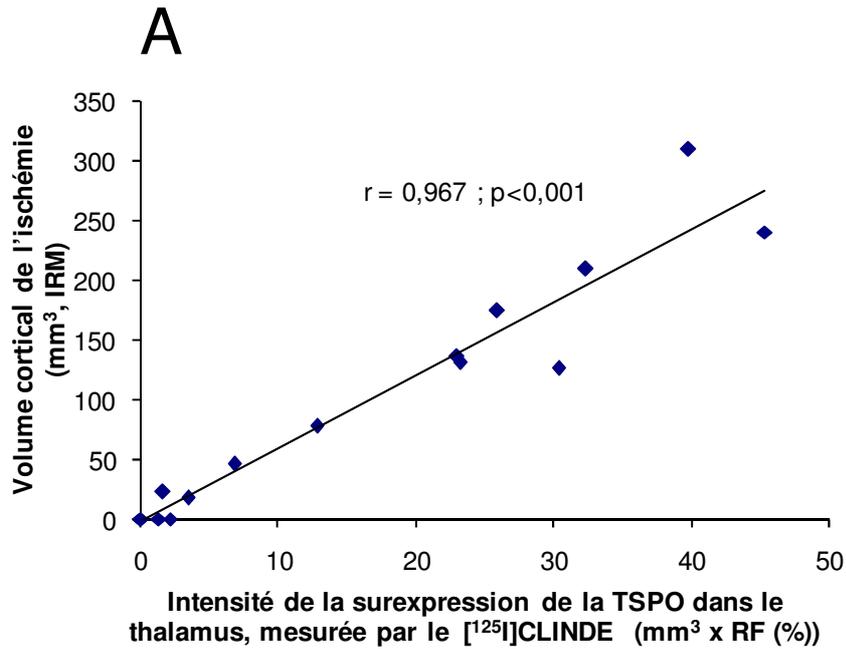
**Tableau V. Quantification du signal radioactif dans le thalamus et la SNr (Bq/mg).**

	Intensité du signal radioactif (Bq/mg)		
	ROI-1 (ipsilatéral)	ROI-2 (controlatéral)	Significativité statistique
<b>Thalamus</b>	5,47 ± 0,61	2,08 ± 0,21	p < 0,01
<b>Substance Noire réticulée</b>	6,51 ± 0,75	1,50 ± 0,12	p < 0,01

Une dégénérescence neuronale ainsi qu'une surexpression des cellules microgliales activées, mises en évidence par les marquages immunohistochimiques anti- NeuN et CD11b, respectivement, ont également été retrouvées dans le thalamus et la SNr.

La mesure du volume thalamique par IRM a également montré une atrophie du thalamus ipsilatéral ( $-11,2 \pm 1,8 \text{ mm}^3$  par rapport au côté controlatéral,  $p < 0,01$ ).

Par ailleurs, nous avons étudié la relation entre le volume de l'infarctus induit par l'occlusion de l'ACM et l'intensité de la neuroinflammation associée au phénomène de diaschisis dans ces structures cérébrales distantes de la lésion primaire. Nous avons observé que l'accumulation du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE dans le thalamus était fortement corrélée au volume de lésion cortical ( $r = 0,967$ ;  $p < 0,001$ ), alors que la fixation nigrale du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE est corrélée au volume de la lésion striatale ( $r = 0,924$ ;  $p < 0,001$ ). Ces relations entre la distribution du traceur dans le thalamus et la SNr et l'intensité de la lésion ischémique sont présentées dans la Figure 39.



**Figure 39.** Relation entre le volume d'ischémie mesuré par IRM et la surexpression de la TSPO mesurée par le [<sup>125</sup>I]-CLINDE, dans le thalamus et la SNr. L'analyse de régression linéaire par le coefficient de Pearson montre une corrélation positive significative ( $p < 0,001$ ) entre le volume cortical d'ischémie et l'intensité de la neuroinflammation dans le thalamus, (A), et entre le volume striatal d'ischémie et l'intensité de la neuroinflammation dans la SNr (B).

## V. Discussion et perspectives

L'objectif principal de ce travail de thèse a consisté à étudier le CLINDE, une imidazopyridine iodée de haute affinité pour la TSPO, dans des modèles animaux de lésions neurologiques entraînant une neuroinflammation focale et d'intensité graduée. Nous avons ainsi pu évaluer la capacité du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE à visualiser l'activation microgliale de façon spécifique, sélective, et à refléter le degré de neuroinflammation induite.

Les résultats décrits précédemment nous amènent à discuter plusieurs points importants concernant l'étude de la neuroinflammation par imagerie moléculaire à l'aide de radiopharmaceutiques ciblant la TSPO. Les éléments de discussion suivants seront abordés :

- L'évaluation du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE dans un modèle de lésion excitotoxique.
- L'évaluation du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE dans des modèles d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne.
- Perspective 1 : application clinique du CLINDE dans l'AVC.
- Perspective 2 : poursuite du travail préclinique par des études *in vivo* en microTEP à l'aide du [ $^{18}\text{F}$ ]-PBR111.

### A. Evaluation du [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE dans un modèle de lésion excitotoxique.

Nous avons choisi le modèle de lésion excitotoxique par injection intrastriatale d'AQ chez le rat car il provoque une inflammation focale bien délimitée et reproductible. De plus, il s'agit d'un modèle reproduisant en partie la physiopathologie humaine de la chorée de Huntington (Schwarcz et al 1983). Afin de moduler l'intensité de cette lésion excitotoxique, nous avons utilisé différentes doses d'AQ (75, 150, et 300 nmol). L'activation microgliale dans le striatum ipsilatéral a été mise en évidence par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps spécifique OX-42. Ce résultat est en accord avec des données de la littérature

utilisant chez le rat des modèles de lésion excitotoxique à l'AQ (Ryu et al 2005) ou à l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique (AMPA) (Boutin et al 2007a; Boutin et al 2007b). De plus nos résultats mettent en évidence une relation positive entre l'intensité du marquage immunohistochimique et la dose d'AQ injectée.

Les études d'autoradiographie *in vitro* menées avec le ligand de référence de la TSPO, le [ $^3$ H]-PK11195, ont également montré une fixation fortement augmentée, comme cela avait été précédemment décrit (Chalon et al 1996; Price et al 1990). Cette hyperfixation est corrélée à la dose d'AQ administrée.

Les études de biodistribution cérébrale *ex vivo* ont mis en évidence une fixation importante du [ $^{125}$ I]-CLINDE dans les structures cérébrales les plus affectées par la lésion (striatum et cortex ipsilatéraux), significativement supérieure au côté non lésé. La spécificité de liaison du [ $^{125}$ I]-CLINDE pour la TSPO a été estimée par des études de saturation au PK11195 (5 mg/kg). Ce prétraitement entraîne une diminution du niveau de la radioactivité mesurée de l'ordre de 75-80 %, quelle que soit la dose d'AQ utilisée. Cette spécificité du CLINDE pour la TSPO avait été précédemment décrite chez le rongeur sain par pré-injection de CLINDE, de PK11195 (Mattner et al 2008) ou de Ro5-4864 (Katsifis et al 2000a). Nos résultats démontrent que la fixation du [ $^{125}$ I]-CLINDE reflète avec précision la variabilité du degré de neuroinflammation (striatum :  $r^2 = 0,9935$  ; cortex :  $r^2 = 0,9979$ ).

Les autoradiographies *ex vivo* apportent la confirmation visuelle que la fixation spécifique du [ $^{125}$ I]-CLINDE sur la TSPO se produit exclusivement dans le striatum et le cortex ipsilatéraux, montrant ainsi une excellente corrélation spatiale avec l'activation microgliale caractérisée par immunohistochimie.

## **B. Evaluation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans des modèles d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne.**

Cette partie du travail expérimental avait pour objectif d'explorer la neuroinflammation dans des structures cérébrales distantes de l'infarctus, mais atteintes par le processus de diaschisis. Nous avons pour cela utilisé 2 modèles d'ischémie cérébrale : un modèle murin d'ischémie permanente par électrocoagulation de l'ACM, et un modèle d'ischémie transitoire par occlusion de l'ACM chez le rat.

Une précédente étude menée chez la souris et utilisant le même modèle d'ischémie permanente que le notre avait caractérisé par immunohistochimie la cinétique d'activation microgliale dans le thalamus à l'aide d'un anticorps primaire anti-CD11b (Rupalla et al 1998). Cet article rapportait la présence de cellules microgliales à l'état activé dès le deuxième jour suivant la lésion ischémique. Le degré de la réaction microgliale augmentait ensuite graduellement au cours du temps jusqu'à 30 jours post-occlusion. En quantifiant la fixation thalamique du [<sup>125</sup>I]-CLINDE sur les autoradiographies *ex vivo*, nous avons retrouvé un même profil temporel d'activation des cellules de la microglie. Les études de compétition ont par ailleurs confirmé que cette accumulation du radioligand dans le thalamus était spécifique de l'expression de la TSPO. Nous avons en effet observé une décroissance du signal radioactif de l'ordre de 80-85 % chez les groupes d'animaux prétraités par un excès de PK11195 ou de CLINDE « froids », mais pas dans le groupe traité avec le flumazénil, ligand spécifique des CBR. Nous avons donc retrouvé par cette technique de quantification sur autoradiographie *ex vivo*, une diminution de la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE équivalente à celle mesurée précédemment au cours de la biodistribution cérébrale *ex vivo* dans le modèle de lésion excitotoxique à l'AQ chez le rat lors d'un blocage spécifique des sites TSPO par une concentration saturante de PK11195 (diminution de 75-80 % quelle que soit la dose d'AQ injectée).

Ces résultats ont donc démontré que le [<sup>125</sup>I]-CLINDE permettait de détecter la neuroinflammation associée au diaschisis dans un modèle d'ischémie cérébrale et de valider notre méthode de quantification du niveau de fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans les structures cérébrales situées à distance de l'infarctus primaire. Par conséquent, nous avons appliqué cette méthodologie dans un modèle d'ischémie cérébrale entraînant une grande variabilité interindividuelle dans l'importance de la lésion, estimée par la mesure du volume de l'infarctus.

Chez le rat, nous avons observé sur les autoradiographies une importante accumulation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans la région corticostriatale vascularisée par l'ACM obstruée. Nous avons également mis en évidence une neuroinflammation associée à un processus de diaschisis ipsilatéral touchant à la fois le thalamus et la SNr. Il avait précédemment été montré que le débit sanguin régional n'était pas modifié dans ces 2 structures par rapport au côté controlatéral après occlusion transitoire de l'ACM de 60 minutes (Nagasawa & Kogure 1990). L'immunohistochimie dirigée contre l'antigène de membrane CD11b a confirmé que cet hypersignal radioactif se superposait avec la présence de cellules microgliales activées. Une étude antérieure associant l'OX-42 et la GFAP comme marqueurs immunohistochimiques respectifs de la microglie activée et des astrocytes, au [<sup>3</sup>H]-PK11195 pour le marquage autoradiographique *in vitro* de la TSPO, concluait que cette dernière était spécifiquement exprimée par les cellules microgliales (Stephenson et al 1995). Les auteurs avaient utilisé un modèle d'ischémie cérébrale globale, et avaient caractérisé la nature des cellules gliales exprimant la TSPO à la fois dans la lésion primaire et dans les sites de lésions secondaires.

Les progrès effectués par l'imagerie moléculaire dans l'étude de la neuroinflammation associée à l'ischémie cérébrale avaient déjà permis de visualiser l'activation microgliale dans le thalamus chez l'animal (Myers et al 1991b) et en recherche clinique (Pappata et al 2000; Price et al 2006). Récemment, ce phénomène a également pu être étudié par IRM

fonctionnelle utilisant des macrophages marqués avec des particules paramagnétiques d'oxyde de fer (Nighoghossian et al 2007). Cependant, nous avons obtenu dans ce travail les premières images réalisées par imagerie moléculaire *ex vivo*, montrant une activation microgliale dans la SNr. Cette inflammation secondaire au sein de la SNr avait auparavant été démontrée uniquement par des techniques *in vitro* (Block & Hong 2005; Myers et al 1991b). La substance noire a des connections neuronales privilégiées avec le striatum. En effet, alors que les projections nigrostriatales sont originaires de la substance noire compacte et sont constituées de neurones dopaminergiques, les faisceaux striatonigraux sont GABAergiques et projettent principalement vers la substance noire réticulée.

La mort neuronale à distance engendrée par le processus de diaschisis consécutif à une ischémie cérébrale a déjà été décrite aussi bien chez le rongeur (Carmichael et al 2004; Justicia et al 2008), le primate non humain (Hirouchi et al 2007), que chez l'homme (Brodthmann et al 2007) et s'accompagne également de la production locale de cytokines pro-inflammatoires (Dihne & Block 2001; Loos et al 2003). Nous avons également pu mettre en évidence une telle atteinte neuronale à la fois qualitativement par immunohistochimie ciblant la protéine nucléaire neuronale NeuN, et quantitativement par mesure de l'atrophie thalamique ipsilatérale.

Il a été démontré que ces dommages neuronaux secondaires résultaient d'une dégénérescence antéro- ou rétrograde : le diaschisis thalamique est dû à la destruction de connections neuronales de la voie rétrograde reliant le thalamus au cortex infarci, alors que le diaschisis nigral s'explique par une dégénérescence antérograde de la voie striatonigrale (Loos et al 2003; Revital et al 2008).

Nous avons utilisé l'IRM pondérée en T2 pour évaluer morphologiquement l'extension de la lésion ischémique dans le cortex et le striatum pour chaque animal. Nous

avons pu ainsi différencier la voie striatonigrale de la voie thalamocorticale, en quantifiant la fixation du [<sup>125</sup>I]-CLINDE comme index indirect de l'atteinte neuronale. En effet, nous avons trouvé une forte corrélation entre d'une part le volume de l'infarctus cortical et le degré de neuroinflammation dans le thalamus, et d'autre part entre le volume de lésion striatale et l'intensité de la neuroinflammation dans la SNr. Cette approche par imagerie multimodale associant IRM anatomique et imagerie moléculaire fonctionnelle nous a donc permis de discriminer différents processus neuroinflammatoires associés au diaschisis.

Des études précédentes avaient démontré une différence dans le profil temporel de la production locale de la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  entre le thalamus et la SNr dans un modèle d'occlusion de l'ACM chez le rat (Loos et al 2003). Par ailleurs, une corrélation significative entre l'importance de l'atrophie striatale et l'atrophie nigrale d'une part, et entre l'atrophie corticale et l'atrophie thalamique d'autre part avait déjà été établie dans un modèle d'occlusion transitoire de l'ACM chez le rat (Hara et al 1993).

Récemment, le processus de dégénérescence rétrograde thalamocorticale a également été mis en évidence par autoradiographie *ex vivo* à l'aide du traceur TEP [<sup>18</sup>F]-D-Proline (Langen et al 2007). Le modèle utilisé était l'ischémie induite par photothrombose dans lequel une illumination transcrâniale par laser chez des animaux préalablement injectés avec un colorant photosensible déclenche une ischémie focale corticale. Ce modèle induit un infarctus cortical très reproductible en taille et en localisation, si bien que les auteurs ont pu montrer que le noyau thalamique où la [<sup>18</sup>F]-D-Proline s'accumulait, changeait avec le site de lésion corticale, et correspondait à des projections neuronales de faisceaux thalamocorticaux. Le mécanisme de fixation de la [<sup>18</sup>F]-D-Proline n'a pas été élucidé, mais la distribution thalamique du traceur correspondait spatialement au marquage immunohistochimique anti-CD11b, suggérant un lien avec la microglie activée.

L'étude du processus de diaschisis post-ischémique et de la neuroinflammation associée est d'autant plus cruciale à la lumière de la pathologie humaine. Il a en effet récemment été démontré que les dysfonctionnements neuronaux dus au diaschisis affectent largement la récupération cérébrale et la neuroplasticité post-AVC (Kriz & Lalancette-Hebert 2009). Par exemple, l'aphasie (Demeurisse et al 1991), de même qu'une faible implication du patient dans sa rééducation (Miyai et al 1997), sont des symptômes attribués à ce phénomène. Par ailleurs, le développement de nouveaux outils thérapeutiques dans la prise en charge de l'AVC implique que la physiopathologie de la maladie soit envisagée dans sa globalité.

### **C. Perspective 1 : application clinique du CLINDE dans l'AVC.**

La neuroinflammation dans l'AVC n'a à ce jour été étudiée par imagerie moléculaire *in vivo* chez l'homme qu'en TEP, à l'aide du [<sup>11</sup>C]-PK11195 (Gerhard et al 2000; Gerhard et al 2005; Pappata et al 2000; Price et al 2006; Ramsay et al 1992). Contrairement à certaines pathologies neurodégénératives dans lesquelles la neuroinflammation est diffuse et d'intensité modérée, nécessitant une quantification précise et délicate du signal radioactif détecté, l'AVC est associé à une activation microgliale intense et bien délimitée. Par conséquent, l'imagerie scintigraphique TEMP semble bien adaptée à l'étude de la neuroinflammation dans l'AVC, Le [<sup>123</sup>I]-CLINDE est, avec le dérivé iodé du PK11195 (Dumont et al 1999), un des 2 seuls radiopharmaceutiques TEMP dont l'injection à l'homme a à ce jour été rapportée (Tamagnan 2008). Combinant ce nouveau traceur TEMP et la résolution des gamma-caméras les plus récentes couplées à un scanner, l'exploration en TEMP de la neuroinflammation dans l'AVC est envisageable....

Cette étude sera prochainement menée dans un projet soutenu par le programme Européen 6 PCRD (DiMI) entre le CHU de Tours et l'unité de recherche en neurobiologie du

CHU de Copenhague (Pr Gitte Knudsen), en collaboration avec l'équipe australienne ANSTO.

**D. Perspective 2 : poursuite du travail préclinique par des études *in vivo* en microTEP à l'aide du [<sup>18</sup>F]-PBR111.**

Ce travail de thèse présente une étude d'imagerie moléculaire réalisée chez le petit animal établissant une corrélation entre l'intensité de la lésion cérébrale induite et le degré de l'activation microgliale résultant de cette lésion.

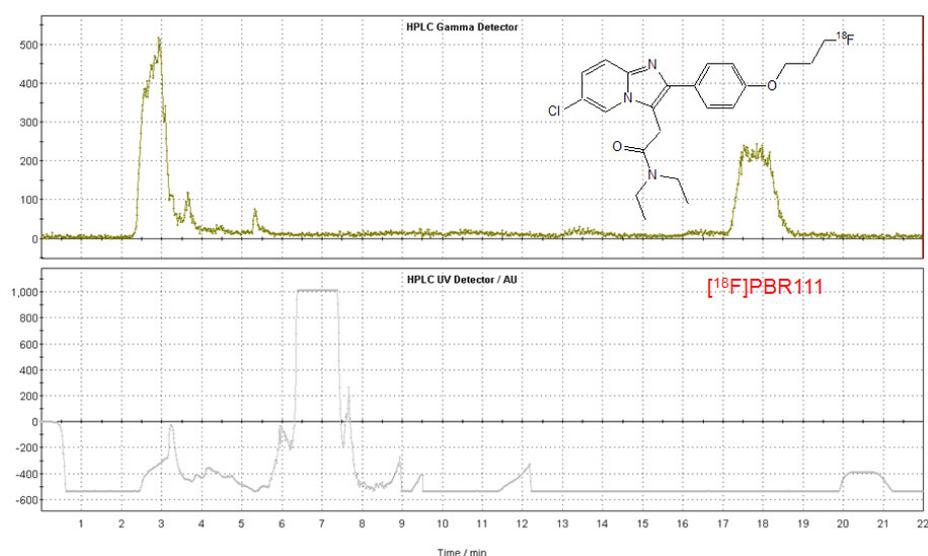
Il serait intéressant de compléter ces résultats par des expérimentations en imagerie *in vivo* utilisant le microTEP. Notre unité INSERM U930 dispose d'une telle machine (Figure 40) qui offre la possibilité de mener des études longitudinales sur un même animal et permet une quantification très précise du signal radioactif détecté. De plus, le microTEP étant couplé à un scanner, il est possible d'obtenir des images de fusion entre l'imagerie anatomique et l'imagerie fonctionnelle.



Figure 38. MicroTEP eXplore VISTA couplée à un scanner (GE-Healthcare), identique à celui utilisé à l'université de Tours

Deux études microTEP ont à ce jour rapporté l'évaluation *in vivo* de la neuroinflammation dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le rat à l'aide du [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195. L'une a utilisé un modèle d'occlusion transitoire de l'ACM et a comparé le signal radioactif mesuré *in vivo* au niveau du foyer ischémique à des résultats obtenus *in vitro*, incluant de l'autoradiographie au [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 et divers marqueurs immunohistochimiques de la neuroinflammation, ciblant la TSPO, la microglie activée, et les astrocytes (Rojas et al 2007). La seconde est une étude microTEP en double traceur associant le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 au [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG dans un modèle d'occlusion permanente de l'ACM (Schroeter et al 2009). A l'inverse des résultats précédemment obtenus *in vivo* dans des modèles d'occlusion transitoire, les auteurs n'ont pas retrouvé d'augmentation de la fixation du traceur dans la

lésion primaire, mais dans une zone cérébrale entourant ce foyer ischémique, et colocalisant avec une consommation en énergie augmentée, mise en évidence par le [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG. Par ailleurs, une étude longitudinale TEP menée chez le babouin avec le [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 a décrit la cinétique de l'activation microgliale, dans la zone de pénombre entourant le foyer ischémique (Sette et al 1993). Plus récemment, parmi les nouveaux radiopharmaceutiques ciblant la TSPO utilisables en TEP, 2 ont également été évalués *in vivo* dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le rat. Il s'agit du [ $^{11}\text{C}$ ]-PBR28 (Imaizumi et al 2007b) et plus récemment du [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA714 (Martin et al 2009). Ces études microTEP ont toutes les 2 également porté sur l'activation microgliale présente dans le foyer ischémique et la zone de pénombre, la seconde ayant permis de caractériser la cinétique d'expression de la TSPO dans un modèle d'occlusion transitoire de l'ACM. Nous disposons à Tours d'un dérivé marqué au fluor 18 appartenant à la même classe chimique que le CLINDE : le [ $^{18}\text{F}$ ]-PBR111 (Fookes et al 2008), (Figure 41). Ce composé fluoré nous semble être un outil intéressant pour confirmer *in vivo* les résultats obtenus au cours de cette thèse, et pour évaluer grâce à un suivi longitudinal l'efficacité de traitements neuroprotecteurs.



**Figure 39. Purification par CLHP du PBR111 marqué au fluor 18. Chromatogramme obtenu à partir du premier marquage de [ $^{18}\text{F}$ ]-PBR111 au Centre d'Etude et de Recherche sur le RadioPharmaceutiques (CERRP), à Tours.**

# Conclusion

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe 3 de l'UMR Inserm U930 - ERL 3106 - "Imagerie & Cerveau" de Tours, en collaboration avec l'ANSTO (Sydney, Australie), et, pour les travaux portant sur l'ischémie cérébrale, avec le laboratoire CERVOxy du centre CYCERON (Caen, France). Elle a été en partie financée grâce au projet européen « Diagnosis Molecular Imaging » (DiMI), dans le cadre du 6<sup>ème</sup> programme cadre de recherche et développement (PCRD) de la Commission Européenne.

Notre étude s'est articulée autour de 2 modèles animaux de lésion cérébrale ayant en commun d'induire une neuroinflammation focale d'intensité modulable, que nous avons étudiée grâce à un radioligand iodé spécifique de la TSPO, le CLINDE. En effet, il est aujourd'hui établi que l'expression de cette protéine dans le cerveau est le marqueur de la neuroinflammation le plus pertinent, et que son étude par imagerie moléculaire présente un grand intérêt pour le diagnostic, la compréhension de la physiopathologie et l'évaluation de traitement de nombreuses maladies neurologiques. Dans une première partie, nous avons démontré la capacité du CLINDE à refléter le degré de la neuroinflammation dans un modèle d'excitotoxicité. Nous avons établi que la fixation cérébrale du traceur était spécifique de la TSPO, confirmant également le lien étroit entre l'amplification de l'expression de cette protéine et l'activation microgliale. Dans un second temps, nous avons porté une attention particulière à la neuroinflammation associée au processus de diaschisis suite à une ischémie focale chez le rongeur. Nous avons évalué par autoradiographie l'intensité de la surexpression de la TSPO dans le thalamus et la substance noire réticulée, et corrélé les résultats obtenus avec le volume de l'infarctus dans le cortex et le striatum, respectivement.

Ces résultats expérimentaux confirment que le CLINDE est un candidat très prometteur pour l'imagerie moléculaire TEMP appliquée à l'exploration de la neuroinflammation dans les pathologies neurologiques. Ce travail représente une étape importante dans le développement d'un nouveau radiopharmaceutique, en faisant le lien entre

l'expérimentation préclinique, via des modèles animaux, et les applications en pathologie humaine. Il ouvre ainsi des perspectives d'une part en recherche clinique, en proposant aux neurologues un nouvel outil pour l'imagerie scintigraphique de l'AVC, et d'autre part pour des expérimentations *in vivo* sur le petit animal à l'aide du microTEP. Ces études précliniques seront prochainement menées au sein de notre unité de recherche. Elles présentent un intérêt majeur pour le développement et la validation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

# Annexes

## Annexe 1

### Liste des articles se rapportant à la thèse

**Arlicot N**, Petit E, Katsifis A, Toutain J, Divoux D, Bodard S, Guilloteau D, Bernaudin M, Chalon S (2009). Detection and quantification of neuroinflammation associated with diaschisis in rodent models of focal ischemia: a multi-modal imaging study using the TSPO radioligand CLINDE (en préparation pour *Neuroimage*).

**Arlicot N**, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, Duval S, Bodard S, Guilloteau D, Chalon S (2008). Evaluation of a high-affinity peripheral-type benzodiazepine receptor radioligand in a rat model of excitotoxicity and microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35(12):2203-11.

### Autres articles

Song PJ, Barc C, **Arlicot N**, Guilloteau D, Bernard S, Sarradin P, Chalon S, Garreau L, Kung H, Lantier F, Vergote J (2009). Evaluation of prion deposition and microglial activation in scrapie-infected mice using molecular imaging probes (en soumission pour *Mol Imaging & Biol*).

**Arlicot N**, Rochefort GY, Schlecht D, Lamoureux F, Grassin J, Marchand S, Antier D (2007). Stability of antibiotics used for bronchial superinfection in portable pumps: a synthesis for the prescriber. *Pediatrics* 120(6):1255-9.

**Arlicot N**, Pourrat X, Bourgoïn-Hérard H, Baud A, Grassin J, Antier D (2007). Are antibiotic drugs well prescribed in case of renal insufficiency? A retrospective study. *Ren Fail* 29(8):1055-8.

### Prix et distinctions obtenus pour des travaux se rapportant à la thèse

**Student travel stipend Award**, *World Molecular Imaging Congress*, Montreal, septembre 2009.

Lauréat du Prix du **Jeune Chercheur Tourangeau 2009** de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

### Communications orales se rapportant à la thèse

#### Congrès Internationaux :

Guilloteau D, **Arlicot N**, Katsifis A, Mattner F, Chalon S. Evaluation of a high-affinity peripheral-type benzodiazepine receptor radioligand in a rat model of excitotoxicity and microglial activation. *Society of Nuclear Medicine*, Washington, juin 2007.

### **Congrès Nationaux :**

**Arlicot N**, Petit E, Katsifis A, Mattner F, Divoux D, Bernaudin M, Guilloteau D, Chalon S. Detection and quantification of neuroinflammation in transient and permanent rodent models of stroke using [<sup>125</sup>I]-CLINDE: an ex vivo autoradiographic study. *Journée Recherche des Facultés de Médecine de Tours et Poitiers*, décembre 2008.

**Arlicot N**, Chalon S, Katsifis A, Guilloteau D. Le CLINDE, radiopharmaceutique de haute affinité pour les TSPO (18 kDa), reflète l'intensité de la neuroinflammation dans un modèle de lésion excitotoxique chez le rat. *Club Français des Radiopharmaceutiques*, Tours, janvier 2008.

**Arlicot N**, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, Duval S, Bodard S, Guilloteau D, Chalon S. Evaluation du CLINDE, nouveau radiotracer SPECT de la protéine translocatrice (18 kDa), reflétant le degré de neuroinflammation dans un modèle de lésion excitotoxique chez le rat. *Société de Circulation et Métabolisme du Cerveau*, Paris, janvier 2008.

**Arlicot N**, Chalon S, Mattner F, Katsifis A, Guilloteau D. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radioligand in a rat model of microglial activation. *Journée Recherche de la Faculté de Médecine de Tours*, novembre 2007.

### **Communications affichées se rapportant à la thèse**

**Arlicot N**, Roussel S, Petit E, Katsifis A, Toutain J, Guilloteau D, Bernaudin M, Chalon S. Autoradiographic detection of neuroinflammation associated with diaschisis after focal cerebral ischemia in rats. *World Molecular Imaging Congress, Montreal*, septembre 2009.

**Arlicot N**, Petit E, Katsifis A, Divoux D, Guilloteau D, Bernaudin M, Chalon S. The 18kDa Translocator protein radioligand CLINDE is an efficient tracer for the in vivo characterisation of thalamic microglial activation in cerebral ischemia. *European Molecular Imaging Meeting, Barcelone*, mai 2009.

**Arlicot N**, Petit E, Katsifis A, Mattner F, Divoux D, Guilloteau D, Bernaudin M, Chalon S. Detection and quantification of TSPO overexpression after permanent focal cerebral ischemia in the mouse using [<sup>125</sup>I]-CLINDE: an ex vivo autoradiographic study. *World Molecular Imaging Congress, Nice*, septembre 2008.

**Arlicot N**, Guilloteau D, Katsifis A, Mattner F, Chalon S. Evaluation of CLINDE as potent peripheral-type benzodiazepine receptor tracer in a rat model of microglial activation. *European Molecular Imaging Meeting, Naples*, juin 2007.

## Annexe 2

### **Detection and quantification of neuroinflammation associated with diaschisis in rodent models of focal ischemia: a multi-modal imaging study using the TSPO radioligand CLINDE.**

N Arlicot<sup>1</sup>, E Petit<sup>2</sup>, A Katsifis<sup>3</sup>, J Toutain<sup>2</sup>, D Divoux<sup>2</sup>, S Bodard<sup>1</sup>, D Guilloteau<sup>1</sup>, M Bernaudin<sup>2</sup>, S Chalon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR Inserm U930 – CNRS FRE2448 - University of Tours - CHRU, Tours, France

<sup>2</sup>CI-NAPS, UMR 6232, University of Caen, University of Paris Descartes, CNRS, CEA, CERVOxy group “Hypoxia and cerebrovascular physiopathology”. CYCERON, Caen, France

<sup>3</sup>Radiopharmaceuticals Research Institute, ANSTO, Menai, Australia

En préparation pour *Neuroimage*

## Abstract

Ischemic stroke is a leading cause of death and disability in the increasingly ageing population of developed countries. Neuroinflammation is involved in the pathophysiology of stroke and might be imaged *in vivo* using radiolabelled ligands targeting the 18kDa Translocator protein (TSPO), a protein which is dramatically upregulated during microglial activation. We aimed to study neuroinflammatory changes associated with diaschisis (neuronal damages in brain areas remote from the primary lesion site) in 2 rodent models of Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) using [ $^{125}$ I]-CLINDE, a promising single-photon emission computed tomography (SPECT) radioligand for the TSPO. In a mouse model of permanent MCAO, *ex vivo* autoradiographic studies demonstrated preferential localisation of [ $^{125}$ I]-CLINDE in the ipsilateral thalamus with a binding that progressed up to 3 weeks after MCAO. [ $^{125}$ I]-CLINDE binding markedly decreased in animals pre-injected with either unlabeled CLINDE or PK11195, while no change was observed in group pretreated with flumazenil, strongly suggesting TSPO specificity in this model of ischemia. In rats subjected to transient MCAO, [ $^{125}$ I]-CLINDE binding in both ipsilateral thalamus and substantia nigra pars reticulata (SNr) was significantly higher than that in intact controlateral tissue and colocalised with activated microglial cells expressing CD11b antigen. Moreover, the intensity of [ $^{125}$ I]-CLINDE binding quantified in thalamus and SNr was strongly correlated to the ischemic volume in the cortex and striatum, respectively, assessed by MRI. *In vivo* molecular imaging using potent TSPO radioligands like CLINDE as an indirect and early hallmark of neuronal death is expected to expand the understanding of neuroinflammation in stroke and guide therapeutic innovation.

## Introduction

Stroke is the most frequent disease of the brain worldwide with far reaching consequences for the society. Ischemic stroke is by far the most common type of stroke, constituting around 80% of all strokes, of which 60% are attributable to middle cerebral artery ischemia (Feigin et al 2009). The penumbra, defined as cerebral region surrounding the ischemic core of the lesion, is constituted by neuronal tissue perfused below the flow threshold for functional disturbance but above that for maintenance of morphological integrity and that may either die or survive (Ginsberg 2003). Therefore, penumbra is the target for a lot of efforts and studies to develop therapy in acute ischemic stroke. However, it might be of great interest for therapy development, follow-up of the disease, and global understanding of pathogenesis of stroke, to also consider pathomechanisms in brain regions remote from the ischemic primary lesion site, subject to secondary neuronal damages defined as diaschisis, as firstly described one century ago (Von Monakow 1906). Indeed, whereas growing body of evidence exists that, experimentally and clinically, post-ischemic inflammation and glial response are involved in the pathophysiology of stroke (Danton & Dietrich 2003), less is known regarding delayed microglial activation associated with diaschisis in these structures distant from the lesion area.

Even if most of experiments on microglial reaction to brain ischemia used *in vitro* techniques, non-invasive imaging modalities, such as functional magnetic resonance imaging (MRI) using macrophages labelled by ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles (Jander et al 2007; Nighoghossian et al 2007), or molecular imaging using positron emission tomography (PET) or single-photon emission computed tomography (SPECT) technology (Gerhard et al 2005; Pappata et al 2000; Price et al 2006), have recently gained importance as tools for *in vivo* assessment of neuroinflammation in stroke.

To date, the main target to explore *in vivo* neuroinflammatory changes in a variety of neurological disorders by molecular imaging is the translocator protein (TSPO; 18 kDa) (Chen & Guilarte 2008; Venneti et al 2006). TSPO, previously named peripheral-type benzodiazepine receptor (Papadopoulos et al 2006a), is a component of a multimeric protein

complex closely associated with a voltage-dependent anion channel and an adenine nucleotide carrier (McEnery et al 1992). Structurally and pharmacologically distinct from the previously described central benzodiazepine receptor, TSPO is located on the outer membrane of mitochondria and is mostly distributed in peripheral organs such as kidney, heart, and steroidogenic tissues like adrenal cortex, ovaries and testis. TSPO is directly or indirectly involved in many functions, including regulation of cholesterol transport (Jamin et al 2005), synthesis of steroid hormones (Lacapere & Papadopoulos 2003) and apoptosis (Maaser et al 2002). TSPO is minimally expressed in intact brain where it is primarily localised in glial cells, including astrocytes and microglia (Benavides et al 1983). Its basal expression rises in several neurodegenerative and acute disorders, including stroke (Price et al 2006), reflecting microglial activation and neuroinflammation (Rojas et al 2007).

In this context, we used here a recently developed TSPO high-affinity ligand, 6-chloro-2-(4-iodophenyl)-3-(N, N-diethyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide or CLINDE, to explore by quantitative ex vivo autoradiography the expression of activated microglia associated with diaschisis in two rodent models of ischemic stroke. CLINDE has demonstrated its ability to pass through the blood-brain barrier and its potency and specificity for TSPO binding (Mattner et al 2008). It has also been shown that CLINDE was able to detect in vivo inflammatory processes characterised by increased density of TSPO in 2 animal models of microglial activation (Arlicot et al 2008; Mattner et al 2005), thus representing a promising SPECT radiotracer for neuroinflammation imaging. The present study was designed in 2 steps to investigate the degree of microglial activation in brain areas remote from the primary ischemic lesion site elicited by middle cerebral artery occlusion (MCAO): (1) a mouse model of permanent MCAO was used to validate the feasibility of detection and quantification of neuroinflammatory changes associated with diaschisis using [<sup>125</sup>I]-CLINDE and (2) a rat model of transient MCAO was used to monitor inflammation in both thalamus and substantia nigra pars reticulata, 2 brain structures subject to diaschisis phenomenon in this model, and to correlate intensity of TSPO upregulation to the degree of ischemia. In parallel, we performed complementary immunohistochemical approaches targeted at activated microglia and neurons.

## Materials and Methods

### *Radiochemical synthesis*

The radioligand [<sup>125</sup>I]-CLINDE was prepared as previously described (Katsifis et al 2000a), with minor modifications. Briefly, the tributyltin precursor (100 µg) in acetic acid (200 µl) was treated with a solution of Na<sup>125</sup>I (specific activity 80 GBq/ µmol; PerkinElmer, France). The iodination was initiated by adding peracetic acid (1-3%, 100 µl), and quenched 5 min later with sodium bisulphite (200 µl, 50 mg/ml). The solution was then neutralised with sodium bicarbonate (200 µl, 50 mg/ml). The product was purified using high performance liquid chromatography (HPLC) with a semipreparative C-18 RP-column (10 x 250 mm Phenomenex) and a mixture of CH<sub>3</sub>CN/0.1 M ammonium acetate (60/40) as mobile phase at a flow rate of 4 ml/min. The retention times of precursor, iodide, and [<sup>125</sup>I]-CLINDE in this system were 4, 5, and 15 min, respectively. The peak corresponding to [<sup>125</sup>I]-CLINDE was collected, passed through a C-18 Sep-Pack (Waters), and eluted with ethanol to eliminate the solvent. The final radiolabelled product was assessed using an analytical C-18 RP-column (4.6 x 250 mm Phenomenex), with the same mobile phase and flow rate as described above. The radiochemical yield following purification was about 85% and the specific activity of [<sup>125</sup>I]-CLINDE was 80 GBq/ µmol.

### *Animals*

All studies were conducted in compliance with French legislation and European directives. Experiments were carried out on adult male Swiss mice and Sprague–Dawley rats (Centre d'élevage René Janvier, France), weighing 37±1g and 279±19g, respectively, at the beginning of the experiment. Animals were housed in a temperature and humidity controlled environment under a 12h light-dark cycle with food and water available ad libitum.

## *Mouse Model of Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion*

### *1-Surgery:*

Permanent focal ischemia was performed under isoflurane (AErrane, Baxter, France) anaesthesia (1.5–2% in N<sub>2</sub>O-O<sub>2</sub>: 70%–30%) in 34 male Swiss mice by bipolar electrocoagulation of the left middle cerebral artery (MCA), as described elsewhere (Freret et al 2006); this procedure results in a reproducible ischemic lesion well-delineated to the temporoparietal cortex. Briefly, a skin incision was made between the orbit and ear. Under an operating microscope, an incision was made dividing the temporal muscle, and the left lateral aspect of the skull was exposed by reflecting the temporal muscle and surrounding soft tissue. The distal course of the middle cerebral artery was then visible through the translucent skull. A small craniotomy was performed with a cooled dental drill. The distal portion of the left middle cerebral artery was then coagulated by bipolar diathermy (Aesculap TB50, Tuttlingen, Germany). Animal's body temperature (37.4±0.7°C) was controlled during the surgery using a homoeothermic blanket (Harvard, les Ulis, France). The muscle and soft tissue were replaced and the incision was sutured. Anaesthesia was discontinued; animals were replaced into their cages and daily examined.

### *2-Ex vivo autoradiography:*

Ex vivo autoradiographic studies were undertaken on ischemic mice by i.v. injection (penis vein) of [<sup>125</sup>I]-CLINDE (1.5MBq in 200 µL normal saline), at 3, 8, 15 and 21 days post-occlusion (dpo) (n=5-6 per group). At 15 dpo, in vivo saturability and nonspecific binding of [<sup>125</sup>I]-CLINDE as well as its selectivity for TSPO versus central benzodiazepine receptors (CBR) were respectively investigated by preinjection, 15 min prior to the radiotracer, of an excess (5 mg/kg) of either unlabeled PK11195 (the TSPO reference ligand, Sigma) or CLINDE and of flumazenil (CBR antagonist, 4 mg/kg, Roche), (n=4 per group). Animals were sacrificed 30 min post [<sup>125</sup>I]-CLINDE injection, brains were removed and frozen at -80°C. Coronal sections (20 µm-thickness) at the level of both temporoparietal cortex and thalamus (AP: 1.32 mm to -0.94 mm and -1.28 mm to -2.12 mm from bregma,

respectively (Franklin & Paxinos 1997)), were then cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica), thaw-mounted on microscope slides (Superfrost, Menzel Glaser) and air-dried at room temperature (RT). Slides together with calibrated  $^{125}\text{I}$  standards ( $^{125}\text{I}$  -microscales; Amersham) were exposed for one week to low energy gamma-sensitive imaging films (Biomax MR<sup>TM</sup> Kodak), then developed (Kodak L24 revelator), fixed (Kodak 3000 fixator), and dried. Autoradiograms were scanned (Scanner Epson Perfection 4870 Photo) and analysed using  $\beta$ -vision+ software (Biospace Mesures). Near-adjacent slices were also stained with cresyl-violet for histologic characterization of the lesion.

### 3-Autoradiographic analysis and quantification:

For each animal, we used [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE uptake (identified by visual inspection as a radioactive hypersignal) to delineate regions of interest (ROIs). ROIs were manually defined for each section of the ipsilateral thalamus showing [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE increased uptake (ROI-1), and mirror ROI (ROI-2) was symmetrically drawn in the homologous controlateral region. Lesion to normal ratio (LNR), defined as [(ROI-1 value (Bq/mg) - ROI-2 value (Bq/mg)) / ROI-2 value (Bq/mg)], was calculated after background subtraction. ROI-1 surface (mm<sup>2</sup>) was multiplied by LNR to assess TSPO overexpression for the section. For each mouse, thalamus was analysed throughout its complete extension, i.e. about 20 sections per brain, and all sections with LNR > 0.8 were considered (a LNR threshold value of 0.8 was chosen considering the lesion detectability of the autoradiographic methods (Watanabe et al 2000)). The total TSPO overexpression in the thalamus was calculated by taking into account data obtained from each section, the thickness of the section and the number of sections analysed. Values of thalamic TSPO overexpression were expressed as cubic millimetres multiplied by LNR (%).

### *Rat Model of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion*

#### *1-Surgery:*

Transient focal ischemia was induced in 17 adult male Sprague-Dawley rats by intraluminal occlusion of the right MCA as previously described (Longa et al 1989), for either 30 minutes (n=8) or 90 minutes (n=9) in order to obtain inter-individual variability in the severity of the corticostriatal lesion. Anaesthesia was induced with 5% isoflurane (AErrane, Baxter, France) and maintained during surgery (2.5% in N<sub>2</sub>O-O<sub>2</sub>: 70%-30%). Rectal temperature (37.5–38°C) was regulated with a heating blanket (Harvard, les Ulis, France) during the whole surgery.

After a midline incision at the neck, the right carotid bifurcation was exposed, and the common carotid artery (CCA), the external carotid artery (ECA), and the internal carotid artery (ICA) were isolated and carefully separated. The CCA was occluded with a clamp while the external carotid artery was electrocoagulated distally. A nylon thread (0.18 mm diameter) with a terminal cylinder of melting glue (3 mm length, 0.38 mm diameter) was introduced into the ECA lumen, and then gently advanced into the ICA until the CBF decreased (between 25% and 75%) or a slight resistance was observed, indicating that the origin of the MCA was occluded. During surgery, the decrease of CBF at the time of occlusion was not always observed or followed by a spontaneous reperfusion in 15% of rats. These animals were excluded from the experiment. After suture, animals were allowed to recover from anaesthesia. Animals were then re-anesthetized to allow reperfusion 30 min or 90 min later and the clamp, placed on the CCA, as well as the nylon thread were withdrawn. Animals recovered rapidly from anaesthesia and returned to their cages; they received 1mL of saline subcutaneously twice daily during the following week, in order to prevent postsurgical dehydration.

### *2-Magnetic Resonance Imaging (MRI) and measurement of infarct volume:*

MRI examinations were undertaken on ischemic rats at 20 days post-occlusion on a 7T Pharmascan 70/16 (Bruker Biospin), with a transmit/receive 38-mm inner diameter resonator. Rats were anesthetized under isoflurane (AErrane, Baxter, France) (2% in N<sub>2</sub>O-O<sub>2</sub>: 70%-30%) and placed in an animal cradle with a stereotactic holder. Rectal temperature was maintained around 38°C with an electric pad. Respiratory rate was continuously monitored using a pneumatic sensor placed under the abdominal region. A gradient-echo pilot scan was used for localization. T2-weighted MRI was performed with a fast spin-echo sequence (RARE with an acceleration factor of 8; effective TE 65 ms; TR 5000 ms; 4 averages; field of view 3.84\*3.84 cm<sup>2</sup>; 20 contiguous slices, slice thickness 0.75 mm; matrix 256\*192 zero-filled to 256\*256; acquisition time 8 min).

The lesion volumes were analysed with ImageJ software (Rasband, 1997-2006). Areas were delineated on the sections and volumes were calculated by multiplying the total area by the distance between sections. For the thalamic atrophy we measure the controlateral and the ipsilateral thalamic volumes and we apply ( $[\text{controlateral-ipsilateral}]/[\text{controlateral}]$ ).

### *3-Ex vivo autoradiography:*

Ex vivo autoradiographic studies were undertaken on ischemic rats by i.v. injection (penis vein) of [<sup>125</sup>I]-CLINDE (3MBq in 500 μL normal saline), at 21 dpo. Animals were sacrificed 30 min post [<sup>125</sup>I]-CLINDE injection, brains were removed and frozen at -80°C. Coronal sections (20 μm-thickness) at the level of the corticostriatal primary infarct site, the thalamus and the substantia nigra pars reticulata (SNr) (AP: 2.20 to -1.30 mm; -1.80 to - 4.30 mm; - 4.52 to - 6.30 mm from bregma, respectively (Paxinos & Watson 1986)), were then cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica), thaw-mounted on microscope slides (Superfrost, Menzel Glaser) and air-dried at room temperature (RT). Slides together with calibrated <sup>125</sup>I standards (<sup>125</sup>I -microscales; Amersham) were exposed for one week to low energy gamma-sensitive imaging films (Biomax MR™ Kodak), then developed (Kodak L24 revelator), fixed (Kodak 3000 fixator), and dried. Autoradiograms were scanned (Scanner Epson Perfection 4870 Photo) and analysed using β-vision+ software (Biospace Mesures).

### *4-Autoradiographic analysis and quantification:*

For each section, we used [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake (identified by visual inspection as a radioactive hypersignal) to delineate ROIs on the ipsilateral side of the lesion in both thalamus and SNr (ROI-1); mirror ROI (ROI-2) was symmetrically drawn in the homologous contralateral region. Lesion to normal ratio (LNR) defined as [(ROI-1 value (Bq/mg) - ROI-2 value (Bq/mg)) / ROI-2 value (Bq/mg)], was calculated after background subtraction. ROI-1 surface (mm<sup>2</sup>) was multiplied by LNR to assess TSPO overexpression for the section. For each rat, thalamus and SNr were analysed throughout their complete extension, i.e. about 29 to 42 sections per structure depending on their size, and all sections with LNR > 0.8 were considered (a LNR threshold value of 0.8 was chosen considering the lesion detectability of the autoradiographic methods (Watanabe et al 2000)). The total TSPO overexpression in the thalamus and SNr was calculated by taking into account data obtained from each section, the thickness of the section and the number of sections analyzed. Values of TSPO overexpression were expressed as cubic millimetres multiplied by LNR (%).

### *5-Immunohistochemistry studies:*

Study of activated microglia and investigation of neuronal degeneration were performed by immunohistochemistry on brains from ischemic rats. Two sets of rat brain sections (20  $\mu\text{m}$ -thickness, thaw-mounted on glass slides (Superfrost)), adjacent to those exposed for ex vivo autoradiography, were used. Coronal sections were quenched with hydrogen peroxide in 0.1 M PBS and incubated in blocking solution containing normal horse serum (Sigma), in order to block endogenous peroxidase and non-specific binding, respectively. Sections were incubated at 37°C for 3 h with the mouse monoclonal primary antibody against either OX-42 (recognizing the CR3 complement receptor present on activated microglia (Robinson et al 1986); Serotec, diluted 1:1000), or NeuN (anti-neuronal nuclei antibody which specifically stains neurons (Xu et al 1997); Millipore, diluted 1:1000) and then incubated at 37°C for 30 min with biotinylated horse anti-mouse IgG (1:100, Sigma). Sections incubated without primary antibodies served as controls for the specificity of the immunostaining. The reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma). Sections were then digitized using a video camera module XC77CE (Sony) associated with a lens AF Micro Nikkor 60 mm (Nikon).

### *Statistical analysis*

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical methods included one-way analysis of variance (ANOVA) and nonparametric analysis (Mann-Whitney & Kruskal-Wallis tests) to determine significant difference. Correlation was assessed with the Pearson correlation coefficient. Statistics were performed using the Statview software (Abacus concepts Inc., USA).

## Results

### *Mouse model of permanent focal cerebral ischemia*

#### *1-Temporal profile of CLINDE binding in thalamus:*

In all mice, permanent MCAO resulted in a well-delineated lesion in the cerebral cortex of the left MCA territory confirmed by cresyl violet staining (Figure 1A). Autoradiographies showed preferential localisation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding in the ischemic cortical region (Figure 1B) with a good spatial correspondence with histological staining. [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding was also increased in the ipsilateral thalamus. In this latter, increased signal was detected as early as 3 dpo ( $p < 0.01$  as compared to controlateral thalamus, paired Student t-test), and the concentration of radioactivity progressed up to 3 weeks after MCAO (Figure 2A), showing a statistically significant gradual expansion of thalamic [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding with time ( $p < 0.05$ , Figure 2B).

#### *2-Competition studies:*

Competition studies, consisting of a pretreatment with unlabeled PK11195 (5 mg/kg), CLINDE (5 mg/kg) or flumazenil (4 mg/kg) 15 min before the radiotracer, were undertaken at 15 dpo. Results are presented in Figure 3. We observed that this pre-treatment with either CLINDE or PK11195 significantly reduced the intensity of thalamic [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding ( $p < 0.001$ ), with the same profile of inhibition (decreases of 84% and 81% with PK11195 and CLINDE, respectively), while no significant difference was observed in group pretreated with flumazenil, strongly suggesting TSPO specificity of [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding in this model of ischemia.

## Rat model of transient focal cerebral ischemia

### *1-Primary lesion site:*

Twenty days after transient MCAO, MRI data highlighted infarction in the occluded MCA territory corresponding to the cortex and lateral part of the striatum, but with a considerable interindividual heterogeneity, global infarct volumes varying from 0 to 340 mm<sup>3</sup> (110±25mm<sup>3</sup>). Due to this heterogeneity, no statistical difference between the 30min MCAO group (73±21mm<sup>3</sup>, n=8) and the 90min MCAO group (143±42mm<sup>3</sup>, n=9) was found (p=0.34, Mann Whitney test). A quantitative comparison of infarct size evaluated by signal change on MRI and neuroinflammatory reaction as defined by area of increased [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake on autoradiographs was not achievable regarding poor quality of autoradiographic corticostriatal sections, due to infarct tissue delicacy. Nevertheless, qualitative assessment of [<sup>125</sup>I]-CLINDE ex vivo autoradiographies and MRI images that displayed signal changes showed a good spatial correspondence between ischemic areas and significant increase of ex vivo [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding, which also overlapped with activated microglia characterised by CD11b immunoreactivity (Figure 4). In contrast, NeuN staining was markedly decreased in the infarct regions as a marker of neuronal loss (data not shown). OX-42-positive cells exhibited phenotypic characteristics of microglia/macrophage cells, with round and amoeboid cell bodies and stout processes.

### *2-Brain regions remote from the ischemic primary lesion site:*

Beyond of the ischemic corticostriatal primary lesion site, we also evidenced TSPO overexpression extended into the ipsilateral thalamus and substantia nigra pars reticulata (SNr) (Figure 5). Indeed, quantification in the sections evaluated including thalamic nuclei and SNr revealed that the radioactive signal was significantly higher in ROI-1 than in the symmetrical ROI-2 (thalamus: 5.47±0.61 Bq/mg in ROI-1 vs 2.08±0.21 Bq/mg in ROI-2; SNr: 6.51±0.75 Bq/mg in ROI-1 vs 1.50±0.12 Bq/mg in ROI-2, p<0.01, paired Student t-test).

This upregulation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding in both ipsilateral thalamus and SNr colocalised with activated microglia and features of neurons degeneration, characterised by OX42 and NeuN immunostaining, respectively. Activated microglial cells in the thalamus and SNr displayed morphology similar to that of reactive microglia in the infarct corticostriatal tissue (not shown). Measure of thalamic volume using quantitative MRI exhibited significant atrophy of the ipsilateral thalamus ( $-11.2 \pm 1.8 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.01$ ).

Otherwise, we also examined whether the degree of neuroinflammation in those brain structures remote from the ischemic primary lesion site was correlated to the infarct volume, assessed by MRI measurements. The accumulation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE in thalamus and SNr increased with the ischemic volume in both ipsilateral cortex and striatum, respectively. A significant positive correlation was highlighted between thalamic [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake and the cortical lesion volume ( $r = 0.967$ ;  $p < 0.001$ ) and between [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake in SNr and the striatal lesion volume ( $r = 0.924$ ;  $p < 0.001$ ). These relations between the cerebral uptake of radioactivity and intensity of the ischemic lesion are presented in Figure 6.

## Discussion

This study was designed to investigate neuroinflammation elicited by occlusion of the middle cerebral artery in brain areas remote from the primary lesion site in 2 rodent models of ischemic stroke.

We have shown in a previous paper that [ $^{125}$ I]-CLINDE is a potent specific TSPO radioligand that reflects accurately the changing degree of neuroinflammation in an excitotoxic rat model of microglial activation (Arlicot et al 2008). We demonstrated that the large increase in TSPO up-regulation in the lesioned brain hemisphere was correlated with the intensity of the lesion and that *in vivo* accumulation of CLINDE was able to discriminate these various degrees of microglial activation. Mattner et al (Mattner et al 2005) also described such a quantitative relationship between [ $^{123}$ I]-CLINDE uptake value and the clinical severity of the injury in rats exhibiting experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis that has a very different physiopathological mechanism from excitotoxic process. These findings offered interesting perspectives regarding other brain disorders and consequently other animal models, especially regarding stroke pathology.

Immunohistochemistry using a CD11b antibody as a marker of microglia was used in a previous study to characterise the temporal profile of microglial activation in the thalamus in the same mouse model of permanent MCAO we used in the first part of this work (Rupalla et al 1998). In this report, the increase in activated microglia expression was detected on day 2 after cerebral ischemia and then gradually spread over the thalamus from 2 to 30 days of occlusion. This time course of microglial activation closely parallels the pattern of uptake of [ $^{125}$ I]-CLINDE we described here. Competition studies confirmed that thalamic [ $^{125}$ I]-CLINDE accumulation was specific binding to TSPO, since the radioactivity uptake was decreased of about 80–85% by saturating doses of cold TSPO-specific ligands (PK11195 or CLINDE), but not by a central benzodiazepine receptor ligand (flumazenil). The specificity of CLINDE binding that we report here had been previously documented in rats by preinjection of non-radioactive CLINDE, PK11195 (Arlicot et al 2008; Mattner et al 2008) or Ro5-4864 (another TSPO ligand) (Katsifis et al 2000a). These results demonstrate that [ $^{125}$ I]-CLINDE was able to detect microglial activation in animal models of cerebral ischemia and validate the quantification of [ $^{125}$ I]-CLINDE uptake value in remote brain structures. Therefore, we performed *ex vivo* studies with [ $^{125}$ I]-CLINDE to further investigate the expression of

neuroinflammation associated with diaschisis in a rat model of transient MCAO, which is known to create inter-individual variability in infarct extension due to the duration of ischemia, but also to different degrees of collateral blood flow (Stoll et al 1998).

As expected, we found in this second experimental setting high accumulation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE in the corticostriatal extent of the lesion again, colocalised with activated microglia. A previous in vitro study, using OX-42 as marker of microglia, glial fibrillary acidic protein (GFAP) for astrocytes, and [<sup>3</sup>H]-PK11195 for TSPO, strongly suggested that TSPO were expressed by microglia rather than astroglia in the primary as well as in secondary lesion sites following transient ischemia in the rat (Stephenson et al 1995). However, the origin of these OX-42-positive cells can be the activation of central resident microglia, or the migration within brain parenchyma of peripheral circulating leukocytes after BBB disruption, since these two cellular populations become indistinguishable under pathological conditions.

We also evidenced neuroinflammation associated with ipsilateral diaschisis produced by focal ischemia in both thalamus and SNr. The advances in molecular imaging of inflammation in stroke have already evidenced this phenomenon in thalamic nuclei in the past decades (Myers et al 1991b), even in the clinical setting (Pappata et al 2000; Price et al 2006). Recently, neuroinflammation in area distant from the infarct tissue has also been monitored by MRI (Justicia et al 2008). However, we present here, according to our knowledge, the first ex vivo images showing neuroinflammation in the SNr, which has only been already described by in vitro techniques (Block & Hong 2005). This inflammation in thalamus and SNr has been reported to be associated with neuronal damages and local production of proinflammatory cytokines (Dihne & Block 2001; Loos et al 2003). This neuronal death consecutive to ischemia has been described in rodents (Carmichael et al 2004; Justicia et al 2008), primate (Hirouchi et al 2007) as well as human brain (Brodtmann et al 2007) using several imaging modalities, and is accompanied with anatomical shrinkage, as we found here for the thalamus. This secondary neuronal damage has been linked to antero- and retrograde degeneration. Diaschisis in ipsilateral thalamus is due to retrograde degeneration associated with the infarct cortex, whereas neuronal loss in SNr is related to anterograde diaschisis from striatum (Loos et al 2003; Revital et al 2008).

We used T2-weighted MRI to morphologically assess the extent of individual lesions in vivo and we differentiated these striatonigral and corticothalamic connections using [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding as an indirect and quantitative index since we evidenced a strong correlation

between infarct cortical and striatal volume and neuroinflammation in the thalamus and SNr, respectively. This combined approach allowed us to distinguish neuroinflammatory processes related to diaschisis in the ischemic brain on an individual basis, both structurally and functionally. Indeed, these different patterns of microglial reaction between thalamus and SNr may reflect pathophysiological differences in neuronal diaschisis phenomenon, as already suggested by Loos et al regarding the induction of the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  after MCAO in rat (Loos et al 2003). Moreover, another significant correlation between the extent of the atrophy in the striatum and that in the substantia nigra and between the extent of the atrophy in the cortex and in the thalamus has already been established (Hara et al 1993). Recently, the process of secondary thalamic retrograde degeneration has also been evidenced by ex vivo autoradiography using the PET tracer [ $^{18}\text{F}$ ]-D-Proline after photochemically induced ischemia (photothrombosis) in the rat cortex (Langen et al 2007). This model is recognized to induce infarcts in superficial brain regions, mainly the cortex, that are highly reproducible in location and size, so that the thalamic nuclei showing [ $^{18}\text{F}$ ]-D-Proline accumulation varied with the site of the cortical lesion corresponding to connected thalamocortical projections. The uptake mechanism of [ $^{18}\text{F}$ ]-D-Proline has not been elucidated by the authors, but the distribution of the tracer was similar to CD11b immunostaining, suggesting a relationship to microglial activation.

Even if it is admitted that the inflammatory changes in remote areas might be involved in the pathogenesis of secondary neuronal damages, (Block & Hong 2005; Loos et al 2003), no obvious direct clinical implication due to thalamic neuronal loss was found (Herve et al 2005). On the other hand, it has been proposed that thalamic neurodegeneration was involved in the ischemia-induced long-lasting sensorimotor deficits in the same rat model of transient MCAO we used in the present study (Freret et al 2006). We can estimate that these brain dysfunctions caused by diaschisis may play a role in poststroke neuroplasticity and affect brain recovery (Kriz & Lalancette-Hebert 2009). Moreover, therapeutic innovations in stroke implicate that the global pathophysiology, including both infarct expansion and inflammatory changes, is properly understood. This finding could improve diagnosis and follow-up of therapeutic interventions by giving a positive image of the brain injury, which is more sensitive for scintigraphic exploration of neuronal loss than a decrease in the binding of a direct neuronal tracer, which also accumulates in intact specific cerebral areas.

To the best of our knowledge, this work presents the first small-animal molecular imaging study correlating the individual degree of microglial activation associated with

diaschisis to the expansion of corticostriatal infarction. Subsequent investigations could take the direction of complementing our results using in vivo imaging techniques such as microPET. Indeed, PET technology has the capability of providing functional data with high resolution and allows absolute quantification. [ $^{11}\text{C}$ ]- PK11195 (the TSPO reference PET radioligand) (Le Fur et al 1983) has been widely used but its bad signal-to-noise ratio (Shah et al 1994) so much than its poor ability to differentiate physiological TSPO density from pathological TSPO small overexpression (Belloli et al 2004) limit its potential clinical applications (Kropholler et al 2005; Venetani et al 2006). Therefore, there is to date a considerable interest in the development of new selective radiopharmaceuticals labelled with either carbon 11 or fluorine 18 for imaging TSPO with PET (Chauveau et al 2008). For instance, pyrazolopyrimidine derivatives ([ $^{11}\text{C}$ ]-DPA713/[ $^{18}\text{F}$ ]-DPA714) and phenoxyphenyl-acetamide derivatives ([ $^{11}\text{C}$ ]-DAA1106/[ $^{18}\text{F}$ ]-FEDAA1106) are two promising chemical classes that have been both validated not only in rodent models of neuroinflammation (Chauveau et al 2009; Maeda et al 2007b; Venetani et al 2007a) but also in non-human primate (James et al 2008; Maeda et al 2004; Zhang et al 2004a) and in living human brain (Endres et al 2009; Fujimura et al 2006; Yasuno et al 2008). Two of these new PET compounds, [ $^{11}\text{C}$ ]-PBR28 (a phenoxyphenyl-acetamide derivative) and recently [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA714 (a pyrazolopyrimidine derivative), have already been evaluated in vitro and in vivo in rat models of cerebral ischemia (Imaizumi et al 2007b; Martin et al 2009). Both studies focused on microglial activation only in the necrotic infarct core and in the penumbra, the latter documenting the time course of TSPO expression after transient MCAO.

Moreover, a fluorine 18 labeled radioligand may be advantageous in some clinical studies as compared to carbon 11 due to its longer physical half-life allowing optimized scanning acquisition protocol. Another advantage is that fluorine 18 labelled radioligands can be transported and delivered to PET centres not having a cyclotron, and then are available for wider clinical use. CLINDE belongs to the imidazopyridine acetamide chemical class for which such a fluorine 18 labelled derivative is already available: [ $^{18}\text{F}$ ]-PBR111 (Fookes et al 2008) might be an efficient candidate to verify in vivo our findings and to explore TSPO expression associated with diaschisis in human stroke.

## **Conclusion**

The present study highlights for the first time using small-animal ex vivo molecular imaging modalities, that long-term neuroinflammatory changes associated with diaschisis in thalamic nuclei and SNr are quantitatively related to cortical and striatal expansion of infarction, respectively, after transient MCAO in rats. These findings suggest that molecular imaging of neuroinflammation is a promising tool to study pathogenetic consequences of stroke and to evaluate the individual benefit for patients of new immunomodulatory therapeutic strategies for weeks after stroke onset (Zaleska et al 2009).

## References

- Arlicot N, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, et al. 2008. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2203-11
- Belloli S, Moresco RM, Matarrese M, Biella G, Sanvito F, et al. 2004. Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo pet imaging of neurodegeneration. *Neurochem Int* 44:433-40
- Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, et al. 1983. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 41:1744-50
- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98
- Brodthmann A, Puce A, Darby D, Donnan G. 2007. fMRI demonstrates diaschisis in the extrastriate visual cortex. *Stroke* 38:2360-3
- Carmichael ST, Tatsukawa K, Katsman D, Tsuyuguchi N, Kornblum HI. 2004. Evolution of diaschisis in a focal stroke model. *Stroke* 35:758-63
- Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Dolle F, Tavitian B. 2008. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [11C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2304-19
- Chauveau F, Van Camp N, Dolle F, Kuhnast B, Hinnen F, et al. 2009. Comparative evaluation of the translocator protein radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation. *J Nucl Med* 50:468-76
- Chen MK, Guilarte TR. 2008. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 118:1-17

- Danton GH, Dietrich WD. 2003. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:127-36
- Dihne M, Block F. 2001. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 889:165-73
- Endres CJ, Pomper MG, James M, Uzuner O, Hammoud DA, et al. 2009. Initial evaluation of 11C-DPA-713, a novel TSPO PET ligand, in humans. *J Nucl Med* 50:1276-82
- Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. 2009. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 8:355-69
- Fookes CJ, Pham TQ, Mattner F, Greguric I, Loc'h C, et al. 2008. Synthesis and biological evaluation of substituted [18F]imidazo[1,2-a]pyridines and [18F]pyrazolo[1,5-a]pyrimidines for the study of the peripheral benzodiazepine receptor using positron emission tomography. *J Med Chem* 51:3700-12
- Franklin K, Paxinos G. 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego
- Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, et al. 2009. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behav Neurosci* 123:224-30
- Fujimura Y, Ikoma Y, Yasuno F, Suhara T, Ota M, et al. 2006. Quantitative analyses of 18F-FEDAA1106 binding to peripheral benzodiazepine receptors in living human brain. *J Nucl Med* 47:43-50
- Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. 2005. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [11C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage* 24:591-5
- Ginsberg MD. 2003. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34:214-23
- Hara H, Harada K, Sukamoto T. 1993. Chronological atrophy after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 618:251-60

- Herve D, Molko N, Pappata S, Buffon F, LeBihan D, et al. 2005. Longitudinal thalamic diffusion changes after middle cerebral artery infarcts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:200-5
- Hirouchi Y, Suzuki E, Mitsuoka C, Jin H, Kitajima S, et al. 2007. Neuroimaging and histopathological evaluation of delayed neurological damage produced by artificial occlusion of the middle cerebral artery in Cynomolgus monkeys: establishment of a monkey model for delayed cerebral ischemia. *Exp Toxicol Pathol* 59:9-16
- Imaizumi M, Kim HJ, Zoghbi SS, Briard E, Hong J, et al. 2007. PET imaging with [11C]PBR28 can localize and quantify upregulated peripheral benzodiazepine receptors associated with cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett* 411:200-5
- James ML, Fulton RR, Vercoullie J, Henderson DJ, Garreau L, et al. 2008. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J Nucl Med* 49:814-22
- Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, et al. 2005. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol* 19:588-94
- Jander S, Schroeter M, Saleh A. 2007. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke* 38:642-5
- Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M. 2008. MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 39:1541-7
- Katsifis A, Mattner F, Dikic B, Papazian V. 2000. Synthesis of substituted [<sup>123</sup>I]imidazo[1,2-a]pyridines as potential probes for the study of the peripheral benzodiazepine receptors using SPECT. *Radiochim Acta* 88:229-32
- Kriz J, Lalancette-Hebert M. 2009. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 117:497-509
- Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Luurtsema G, et al. 2005. Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[11C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:842-51

- Lacapere JJ, Papadopoulos V. 2003. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68:569-85
- Langen KJ, Salber D, Hamacher K, Stoffels G, Reifenberger G, et al. 2007. Detection of secondary thalamic degeneration after cortical infarction using cis-4-18F-fluoro-D-proline. *J Nucl Med* 48:1482-91
- Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, Imbault F, Flamier A, et al. 1983. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life Sci* 32:1839-47
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91
- Loos M, Dihne M, Block F. 2003. Tumor necrosis factor-alpha expression in areas of remote degeneration following middle cerebral artery occlusion of the rat. *Neuroscience* 122:373-80
- Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, et al. 2007. Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* 27:10957-68
- Maeda J, Suhara T, Zhang MR, Okauchi T, Yasuno F, et al. 2004. Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [11C]DAA1106 for PET: an imaging tool for glial cells in the brain. *Synapse* 52:283-91
- Martin A, Boisgard R, Theze B, Van Camp N, Kuhnast B, et al. 2009. Evaluation of the PBR/TSP0 radioligand [(18)F]DPA-714 in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*
- Mattner F, Katsifis A, Staykova M, Ballantyne P, Willenborg DO. 2005. Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:557-63

- Mattner F, Mardon K, Katsifis A. 2008. Pharmacological evaluation of [123I]-CLINDE: a radioiodinated imidazopyridine-3-acetamide for the study of peripheral benzodiazepine binding sites (PBBS). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:779-89
- McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3170-4
- Myers R, Manjil LG, Frackowiak RS, Cremer JE. 1991. [3H]PK 11195 and the localisation of secondary thalamic lesions following focal ischaemia in rat motor cortex. *Neurosci Lett* 133:20-4
- Nighoghossian N, Wiart M, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, et al. 2007. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke* 38:303-7
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, et al. 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27:402-9
- Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, et al. 2000. Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [11C]PK1195. *Neurology* 55:1052-4
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. . New York
- Price CJ, Wang D, Menon DK, Guadagno JV, Cleij M, et al. 2006. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke* 37:1749-53
- Revital S, Hagai B, Gadi G. 2008. Evidence for the coexistence of segregated and integrated functional connections from the striatum to the substantia nigra in rats. *Neuroimage* 40:451-7
- Robinson AP, White TM, Mason DW. 1986. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 57:239-47

- Rojas S, Martin A, Arranz MJ, Pareto D, Purroy J, et al. 2007. Imaging brain inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and induction of the peripheral-type benzodiazepine receptor after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1975-86
- Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C. 1998. Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol* 96:172-8
- Saleh A, Schroeter M, Jonkmanns C, Hartung HP, Modder U, Jander S. 2004. In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain* 127:1670-7
- Shah F, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. 1994. Synthesis of the enantiomers of [N-methyl-11C]PK 11195 and comparison of their behaviours as radioligands for PK binding sites in rats. *Nucl Med Biol* 21:573-81
- Stephenson DT, Schober DA, Smalstig EB, Mincy RE, Gehlert DR, Clemens JA. 1995. Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 15:5263-74
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56:149-71
- Sutter AP, Maaser K, Hopfner M, Barthel B, Grabowski P, et al. 2002. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human esophageal cancer cells. *Int J Cancer* 102:318-27
- Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Slagel SL, Mason NS, et al. 2007. A comparison of the high-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligands DAA1106 and (R)-PK11195 in rat models of neuroinflammation: implications for PET imaging of microglial activation. *J Neurochem* 102:2118-31
- Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. 2006. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 80:308-22
- Von Monakow C. 1906. Aphasie und diaschisis. *Neurol. Centralbl.* 25:1026-38
- Watanabe Y, Nakano T, Yutani K, Nishimura H, Kusuoka H, et al. 2000. Detection of viable cortical neurons using benzodiazepine receptor imaging after reversible focal

ischaemia in rats: comparison with regional cerebral blood flow. *Eur J Nucl Med* 27:308-13

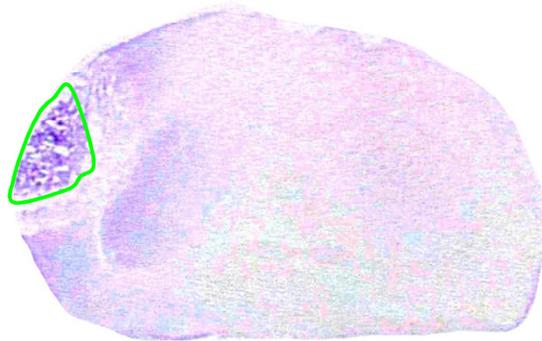
Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, et al. 1997. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 3:997-1004

Yasuno F, Ota M, Kosaka J, Ito H, Higuchi M, et al. 2008. Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by positron emission tomography with [11C]DAA1106. *Biol Psychiatry* 64:835-41

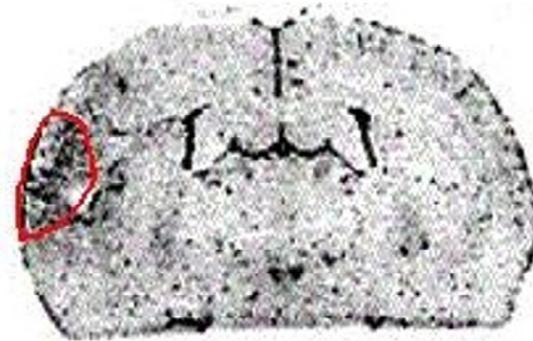
Zaleska MM, Mercado ML, Chavez J, Feuerstein GZ, Pangalos MN, Wood A. 2009. The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology* 56:329-41

Zhang MR, Maeda J, Ogawa M, Noguchi J, Ito T, et al. 2004. Development of a new radioligand, N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-[18F]fluoroethyl-5-methoxybenzyl) acetamide, for pet imaging of peripheral benzodiazepine receptor in primate brain. *J Med Chem* 47:2228-35

# Figure 1



A: Cresyl violet staining



B: [ $^{125}$ I]-CLINDE ex vivo autoradiography

## Figure 2

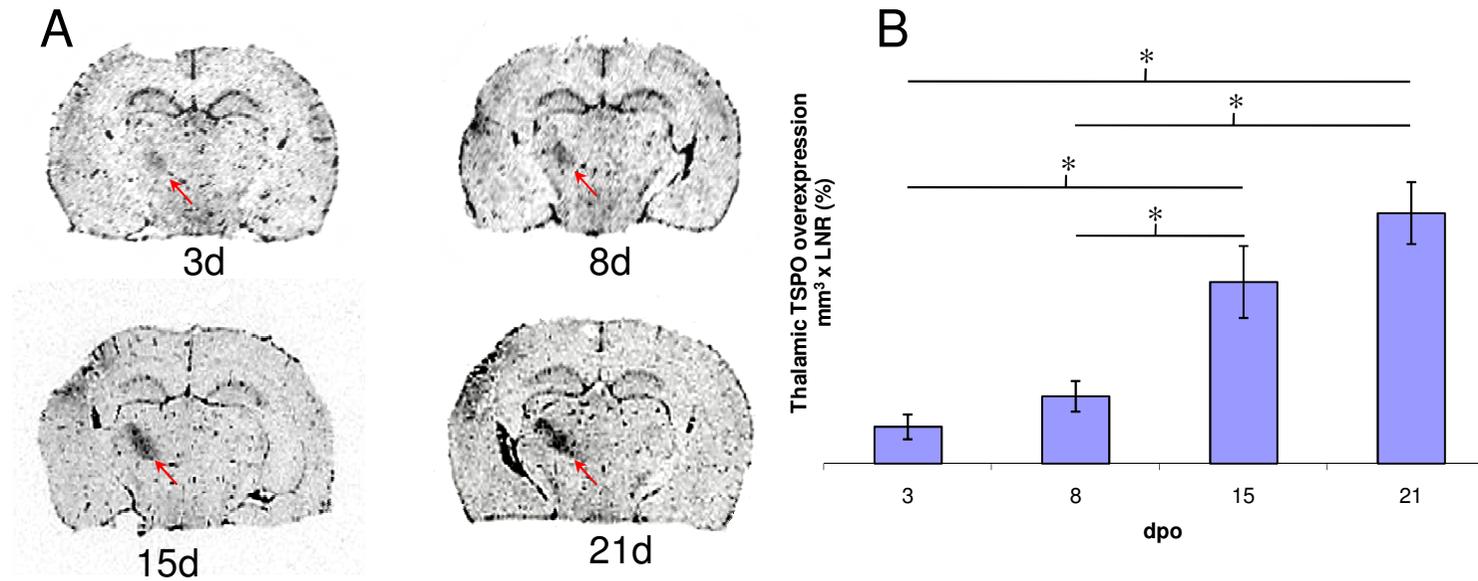


Figure 2. Temporal profile of TSPO overexpression in ipsilateral thalamus after MCA occlusion using ex vivo [<sup>125</sup>I]-CLINDE autoradiography analysis.

(A) Representative ex vivo autoradiographic images showing [<sup>125</sup>I]-CLINDE accumulation after permanent MCA occlusion. Coronal sections at the level of thalamus from ischemic mice following 3, 8, 15, or 21 days of permanent MCAO are depicted.

(B) Quantitative data showing the time-course of TSPO overexpression assessed by [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding after permanent MCAO. \*  $p < 0.05$  (ANOVA).

# Figure 3

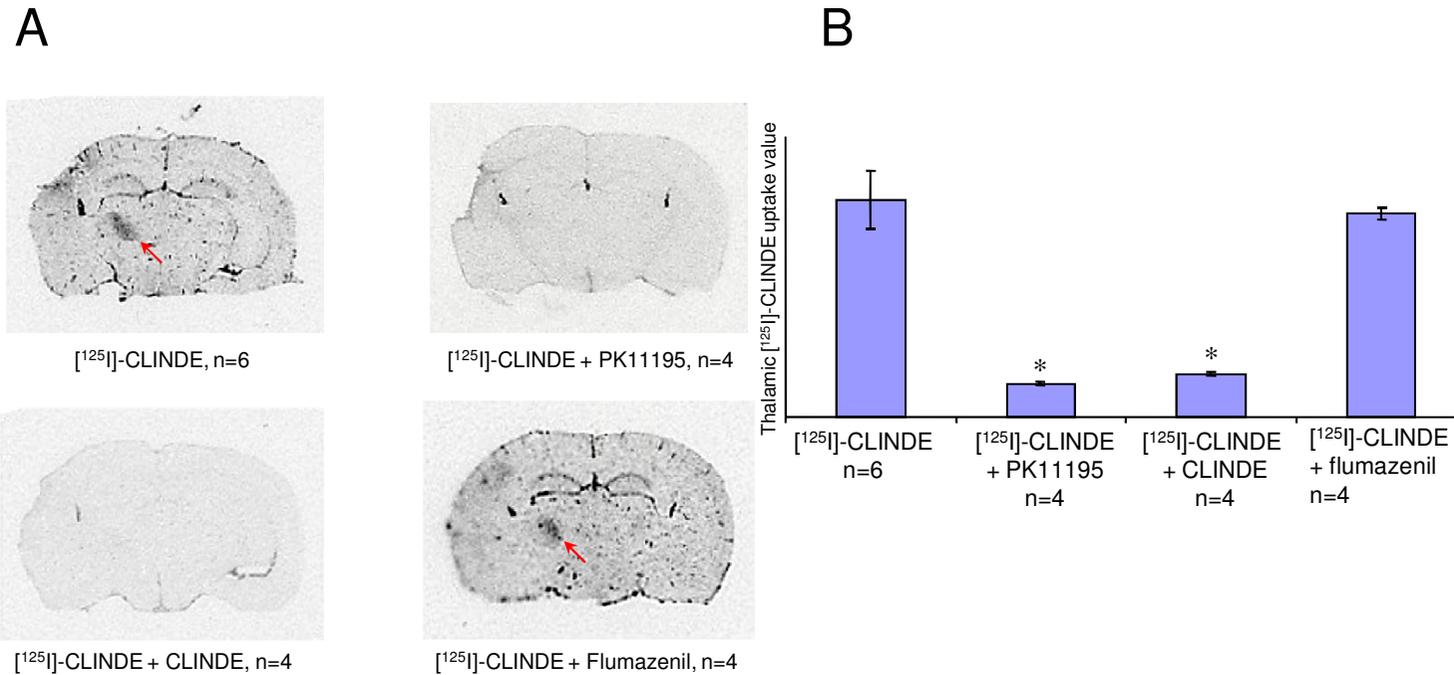


Figure 3. Effects of pretreatment with PK11195 and CLINDE (TSPO selective ligands) or flumazenil (central benzodiazepine receptor selective ligand) on [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding in thalamus of mice, 15 days after the onset of MCA permanent occlusion, using ex vivo autoradiography analysis.

(A) Representative ex vivo autoradiographic images showing [<sup>125</sup>I]-CLINDE accumulation at the level of thalamus from ischemic mice.

(B) Quantitative data showing significant decrease of [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding in ipsilateral thalamus after pretreatment with either PK11195 or CLINDE, but not with flumazenil. \*  $p < 0.001$  between control group ([<sup>125</sup>I]-CLINDE and pre-injected groups with either unlabeled PK11195 or CLINDE (ANOVA).

# Figure 4

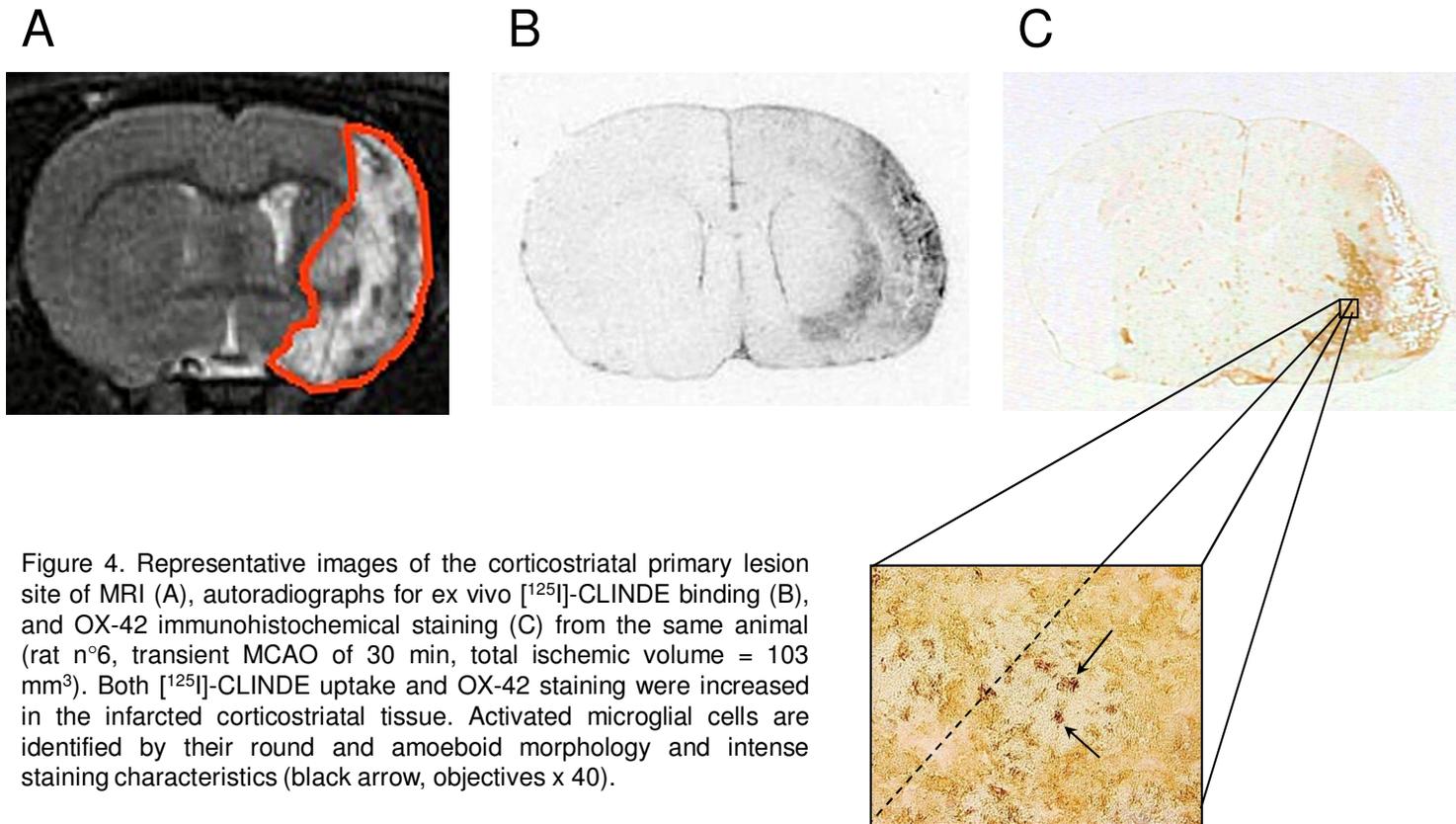


Figure 4. Representative images of the corticostriatal primary lesion site of MRI (A), autoradiographs for ex vivo [<sup>125</sup>I]-CLINDE binding (B), and OX-42 immunohistochemical staining (C) from the same animal (rat n°6, transient MCAO of 30 min, total ischemic volume = 103 mm<sup>3</sup>). Both [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake and OX-42 staining were increased in the infarcted corticostriatal tissue. Activated microglial cells are identified by their round and amoeboid morphology and intense staining characteristics (black arrow, objectives x 40).

## Figure 5

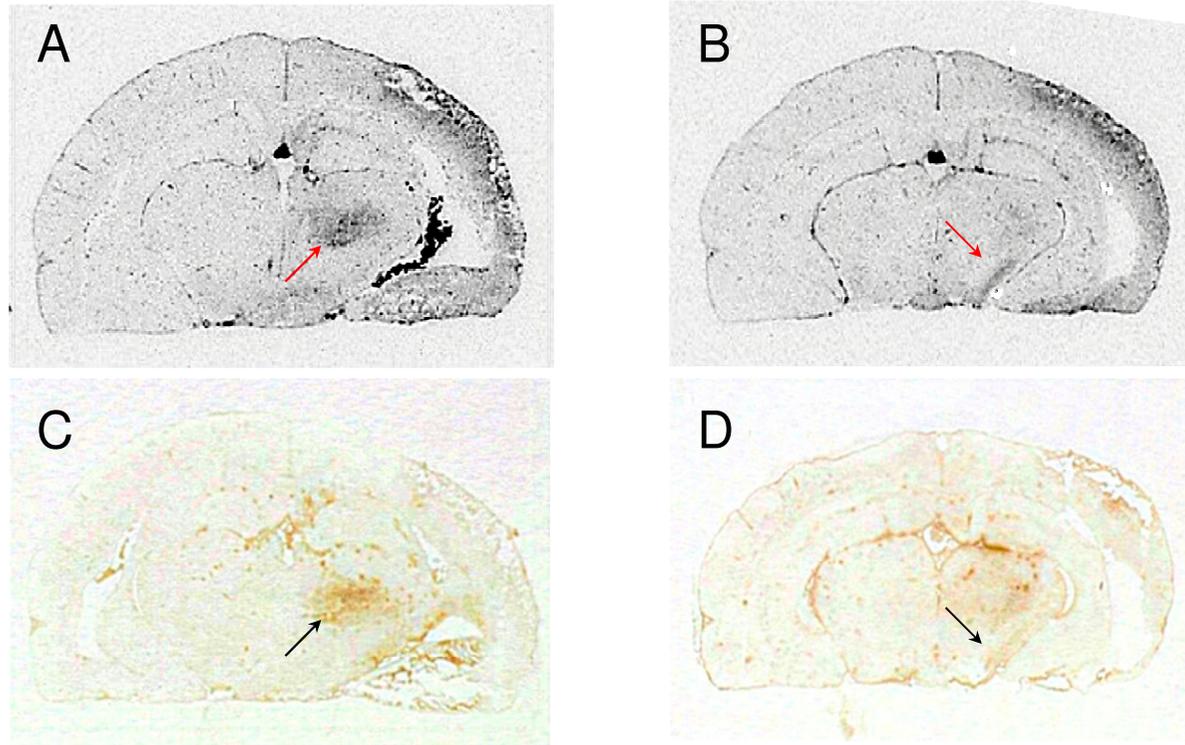


Figure 5. Typical example of signal enhancement when compared to the controlateral hemisphere, resulting from CLINDE specific binding to TSPO in thalamus (A) and in a narrow zone that was concentrated within SNr (B). These regional higher [ $^{125}$ I]-CLINDE uptake values coincided with an increase in immunohistochemical staining with the microglia sensitive anti-CD11b antibody both ipsilateral thalamus (C) and SNr (D). Images from rat n°8, transient MCAO of 90 min, total ischemic volume = 248 mm<sup>3</sup>).

# Figure 6

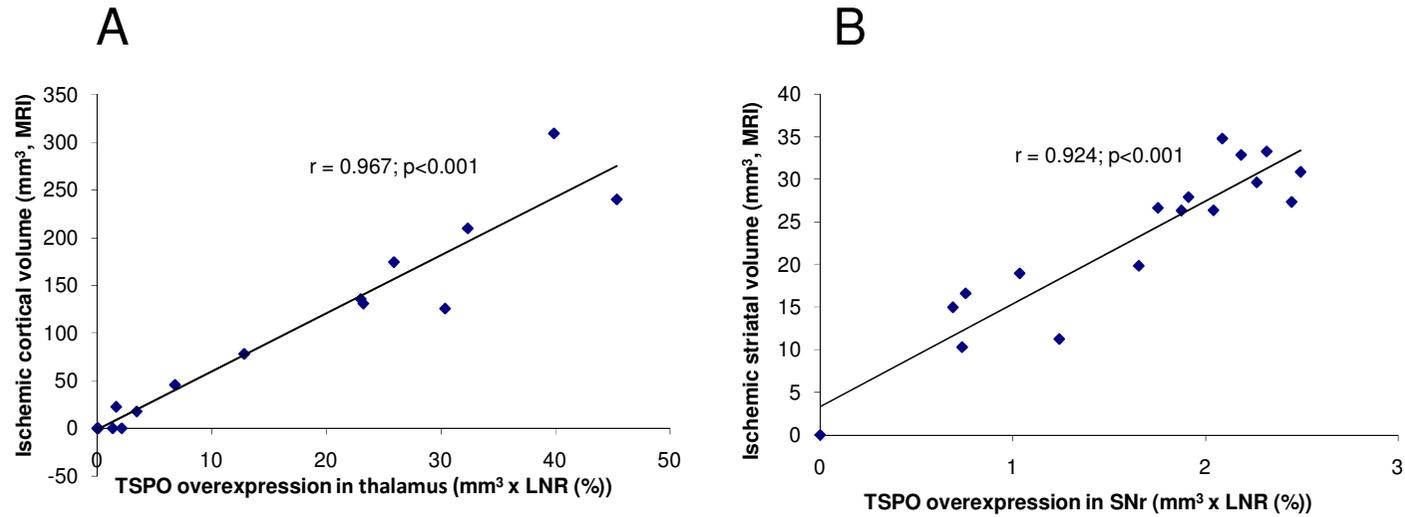


Figure 6. Relation between infarct volume assessed by MRI and TSPO upregulation, estimated by quantification of [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake values in thalamus and SNr. Total specific [<sup>125</sup>I]-CLINDE uptake value is the volume of the structure exhibiting TSPO upregulation, corrected for each section by the LNR. Regression analysis yielded a significant positive correlation ( $p < 0.001$ ) between cortical ischemic volume and neuroinflammation in thalamus (A), and between striatal ischemic volume and neuroinflammation in SNr (B).

### **Annexe 3**

## **Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation**

N Arlicot<sup>1</sup>, A Katsifis<sup>2</sup>, L Garreau<sup>1</sup>, F Mattner<sup>2</sup>, J Vergote<sup>1</sup>, S Duval<sup>1</sup>, S Bodard<sup>1</sup>, D Guilloteau<sup>1</sup>, S Chalon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR Inserm U930 – CNRS FRE2448 - University of Tours - CHRU, Tours, France

<sup>2</sup>Radiopharmaceuticals Research Institute, ANSTO, Menai, Australia

*Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2203-11, **2008**

## Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation

Nicolas Arlicot · Andrew Katsifis · Lucette Garreau ·  
Filomena Mattner · Jackie Vergote · Stéphanie Duval ·  
Sylvie Bodard · Denis Guilloteau · Sylvie Chalon

Received: 19 December 2007 / Accepted: 2 May 2008  
© Springer-Verlag 2008

### Abstract

**Background** The translocator protein (TSPO; 18 kDa), the new name of the peripheral-type benzodiazepine receptor, is localised in mitochondria of glial cells and expressed in very low concentrations in normal brain. Their expression rises after microglial activation following brain injury. Accordingly, TSPO are potential targets to evaluate neuro-inflammatory changes in a variety of CNS disorders.

**Purpose** To date, only a few effective tools are available to explore TSPO by SPECT. We characterised here 6-chloro-2-(4-iodophenyl)-3-(*N,N*-diethyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acetamide or CLINDE in a rat model with different stages of excitotoxic lesion.

**Method** Excitotoxicity was induced in male Wistar rats by unilateral intrastriatal injection of different amounts of quinolinic acid (75, 150 or 300 nmol). Six days later, two

groups of rats ( $n=5-6$ /group) were i.v. injected with [ $^{125}$ I]-CLINDE (0.4 MBq), one group being pre-injected with PK11195 (5 mg/kg). Brains were removed 30 min after tracer injection and the radioactivity of cerebral areas measured. Complementary *ex vivo* autoradiography, *in vitro* autoradiography ([ $^3$ H]-PK11195) and immunohistochemical studies (OX-42) were performed on brain sections. **Results** In the control group, [ $^{125}$ I]-CLINDE binding was significantly higher ( $p<0.001$ ) in lesioned than that in intact side. This binding disappeared in rats pre-treated with PK11195 ( $p<0.001$ ), showing specific binding of CLINDE to TSPO. *Ex vivo* and *in vitro* autoradiographic studies and immunohistochemistry were consistent with this, revealing a spatial correspondence between radioactivity signal and activated microglia. Regression analysis yielded a positive relation between the ligand binding and the degree of neuroinflammation.

**Conclusion** These results demonstrate that CLINDE is suitable for TSPO *in vivo* SPECT imaging to explore their involvement in neurodegenerative disorders associated with microglial activation.

**Keywords** Excitotoxicity · Inflammation · Microglia · Peripheral benzodiazepine receptor · SPECT

N. Arlicot · L. Garreau · J. Vergote · S. Duval · S. Bodard ·  
D. Guilloteau · S. Chalon (✉)  
Insem, U930,  
Tours 37000, France  
e-mail: sylvie.chalon@univ-tours.fr

N. Arlicot · L. Garreau · J. Vergote · S. Duval · S. Bodard ·  
D. Guilloteau · S. Chalon  
Université François Rabelais,  
Tours 37000, France

N. Arlicot · S. Duval · D. Guilloteau · S. Chalon  
CHRU de Tours,  
Tours 37000, France

A. Katsifis · F. Mattner  
Radiopharmaceuticals Research Institute,  
Australian Nuclear Science and Technology Organisation,  
Sydney, Australia

### Introduction

The translocator protein (TSPO; 18 kDa), previously named peripheral-type benzodiazepine receptor [1], is a component of a multimeric protein complex closely associated with a voltage-dependent anion channel and an adenine nucleotide carrier [2]. Structurally and pharmacologically distinct from the previously described central benzodiazepine receptor,

TSPO is located on the outer membrane of mitochondria and is mostly distributed in peripheral organs such as kidney, heart, and steroidogenic tissues like adrenal cortex, ovaries and testis. TSPO is directly or indirectly involved in many functions, including regulation of cholesterol transport [3], synthesis of steroid hormones [4] and apoptosis [5]. TSPO is minimally expressed in intact brain where it is primarily localised in glial cells, including astrocytes and microglia [6], the brain's indigenous macrophages population that is ubiquitously shared out the CNS. Its basal expression rises in several acute and neurodegenerative disorders, including stroke [7], Alzheimer's disease [8], Parkinson's disease [9], multiple sclerosis [10], Huntington's disease [11] and amyotrophic lateral sclerosis [12], reflecting microglial activation and neuroinflammation [13].

Accordingly, TSPO is a potential target to explore *in vivo* neuroinflammatory changes in a variety of neurological disorders with both positron emission tomography (PET) and single-photon emission computed tomography (SPECT) [14]. This could improve diagnosis and follow-up of therapeutic interventions by giving a positive image of the brain injury. Such a tracer might be more sensitive for scintigraphic exploration of neuronal loss than a decrease in the binding of a direct neuronal tracer, which also accumulates in intact specific cerebral areas. Radiolabelled derivatives of the TSPO reference ligand isoquinoline carboxamide PK11195 [15, 16] ( $4 \text{ nM} < K_d < 20 \text{ nM}$ ) have been widely used but their bad signal-to-noise ratio [17] so much as their poor ability to differentiate physiological TSPO density from pathological TSPO small overexpression [18] limit their potential clinical applications [14, 19]. There is therefore, to date, a lack of effective tools to explore TSPO by *in vivo* molecular imaging, and a strong impetus to produce new selective radioligands suitable for TSPO neuroimaging using either SPECT or PET recently occurred [18, 20–23].

Among these new compounds, the recently developed TSPO high-affinity ligand 6-chloro-2-(4-iodophenyl)-3-(*N,N*-diethyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acetamide or CLINDE ( $K_d=1.7 \text{ nM}$ ) has demonstrated its ability to pass through the brain–blood barrier and its potency and specificity for TSPO binding [24]. It has also been shown that CLINDE was able to detect *in vivo* inflammatory processes characterised by increased density of TSPO in an animal model of multiple sclerosis [25], thus representing a promising SPECT radiotracer for neuroinflammation imaging.

Several mechanisms contribute to neuroinflammatory process, among the main ones excitotoxicity [26]. The purpose of this work was to better characterise CLINDE before potential *in vivo* clinical application. For this, we evaluated the properties of this tracer in a rat model of increasing degrees of striatal excitotoxic lesion aimed at

simulating gradual neuroinflammatory stages. In parallel, we characterised these different stages of excitotoxic injury using complementary *in vitro* approaches such as autoradiography with the reference ligand [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 and immunohistochemistry targeted at activated microglia.

## Materials and methods

### Radiochemical synthesis

The radioligand [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE was prepared as previously described [27], with minor modifications. Briefly, the tributyltin precursor (100  $\mu\text{g}$ ) in acetic acid (200  $\mu\text{l}$ ) was treated with a solution of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (specific activity 80 GBq/ $\mu\text{mol}$ ; Amersham, Buckinghamshire, UK). The iodination was initiated by adding peracetic acid (1–3%, 100  $\mu\text{l}$ ) and quenched 5 min later with sodium bisulphite (200  $\mu\text{l}$ , 50 mg/ml). The solution was then neutralised with sodium bicarbonate (200  $\mu\text{l}$ , 50 mg/ml). The product was purified using high-performance liquid chromatography with a semipreparative C-18 RP-column (7.8 $\times$ 300 mm  $\mu\text{bonda-pack}$ , Waters) and a mixture of  $\text{CH}_2\text{CN}/0.1 \text{ M}$  ammonium acetate (60/40) as mobile phase at a flow rate of 1.5 ml/min. The retention times of precursor, iodide, and [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE in this system were 7, 10, and 17 min, respectively. The peak corresponding to [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE was collected, passed through a C-18 Sep-Pack (Waters), and eluted with ethanol to eliminate the solvent. The final radiolabelled product was assessed using an analytical C-18 RP-column (4.1 $\times$ 250 mm PRP+, Cluzeau), with the same mobile phase and flow rate as described above. The radiochemical yield following purification was about 70%, and the specific activity of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE was 80 GBq/ $\mu\text{mol}$ .

### Animal surgery

All studies were conducted according to French legislation and European directives. Male Wistar rats (Centre d'élevage René Janvier, France) weighing  $338\pm 9 \text{ g}$  (mean  $\pm$  SD) were kept in a temperature ( $23\pm 0.5\%$ ) and humidity ( $43\pm 8\%$ )-controlled environment under a 12-h light–dark cycle with food and water available *ad libitum*.

A total of 56 animals were used for experiments described below. Rats were anaesthetised with isoflurane (4% for anaesthesia induction and thereafter 2% for its maintenance) and placed in a stereotaxic David Kopf apparatus (tooth bar:  $-3.3 \text{ mm}$ ). Animals were unilaterally injected with different amounts (75, 150 or 300 nmol) of quinolinic acid (QA; Sigma; dissolved in 0.1 M PBS, pH 7.4) into the right striatum (injection rate 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) using a 25- $\mu\text{l}$  microsyringe (Hamilton) and a micropump (KD

Scientific). QA (2  $\mu$ l) was injected at the following coordinates: AP: +0.7 mm; ML: -3 mm; DV: -5.5 mm from bregma, according to [28]. Animal's body temperature ( $36.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ) was controlled during the surgery by using a thermal probe. The injection syringe was left in place for an additional 4 min to avoid QA backflow, and then slowly removed. The scalp was sutured and animals replaced into their cages and examined daily until sacrifice.

#### Ex vivo cerebral biodistribution of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE, blocking studies and ex vivo autoradiography

For each amount of infused QA (75, 150 or 300 nmol), ex vivo cerebral biodistribution studies were performed with [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE 6 days after surgery. Rats were i.v. injected (penis vein) with 0.37 MBq of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE in 300  $\mu$ l normal saline, with (pre-injected group,  $n=5-6$ ) or without (control group,  $n=5-6$ ) a pre-injection of PK11195 (5 mg/kg; Sigma), 15 min before the radiotracer. Animals were sacrificed 30 min post [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE injection. Several brain areas (cerebellum, left and right hippocampus, left and right frontal cortex and left and right striatum) were removed and weighed, and their radioactivity was measured using an automated gamma counter (Cobra 5010, Packard). The percentage of injected dose per gram tissue (%ID/g) was calculated by comparison with samples to standard dilutions of the initial dose.

Ex vivo autoradiography studies were performed with [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE to illustrate the localization of its cerebral binding. Two rats were i.v. injected (penis vein) 6 days after surgery (300 nmol QA) with 1.33 MBq of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE in 300  $\mu$ l normal saline, with (pre-injected rat) or without (control rat) an injection of PK11195 (5 mg/kg; Sigma), 15 min prior to the radiotracer. Animals were sacrificed 30 min post [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE injection; brains were removed and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . Coronal striatal sections (20  $\mu$ m thickness) were then cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica), thaw-mounted on microscope slides and air-dried at room temperature (RT). Slides were exposed to iodide-sensitive films (Biomax MR<sup>TM</sup> Kodak) for 6 weeks and then developed (Kodak L24 revelator), fixed (Kodak 3000 fixator) and dried. Autoradiograms were scanned using a Scanner Epson Perfection 4870 Photo.

#### In vitro autoradiography with [ $^3\text{H}$ ]-PK11195

After lesioning as described above, the density of brain-specific TSPO binding sites was measured by in vitro autoradiographic experiments using [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 (Perkin Elmer, specific activity 3.14 GBq/ $\mu$ mol). Fifteen male Wistar rats (five per amount of QA) lesioned as described above were used. Brains were removed 6 days after lesion and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . Coronal striatal sections (20  $\mu$ m

thickness) were then cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica) and thaw-mounted on microscope slides (Superfrost+, Menzel Glaser). The sections were incubated for 30 min at RT in a 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) containing 1 nM [ $^3\text{H}$ ]-PK11195. Non-specific binding was assessed by incubation of adjacent striatal sections in the presence of 1  $\mu$ M PK11195 (Sigma). Sections were rinsed twice in cold buffer ( $4^\circ\text{C}$ ) for 5 min, dipped in distilled water and dried at RT. Slides together with calibrated  $^3\text{H}$  standards ( $^3\text{H}$ -microscales; Amersham) were exposed for 8 weeks to tritium-sensitive films (Biomax MR<sup>TM</sup> Kodak) and then developed (Kodak L24 revelator), fixed (Kodak 3000 fixator) and dried. Autoradiograms were scanned (Scanner Epson Perfection 4870 Photo) and analysed. For each animal, we used the TSPO overexpression in the striatum (identified by visual inspection as a radioactive hypersignal) to delineate regions of interest (ROIs). ROIs were manually defined for each rat in the lesioned right striatum showing [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 high uptake (ROI-1) and mirror ROI (ROI-2) was symmetrically drawn in the homologous contralateral region. The relative specific in vitro binding of [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 defined as the ratio of value for an ROI-1 in the right hemisphere to value for the contralateral homologous ROI-2 and calculated after background subtraction was measured using  $\beta$ -vision+ software (Biospace Mesures). At least five matched sections from each animal were used for quantification.

#### Immunohistochemistry studies

The relationship between the degree of excitotoxicity and intensity of microglial activation was also investigated using immunohistochemistry. Twelve male Wistar rats (four per amount of QA) lesioned as described above were used. Six days after QA lesion, rats were anaesthetised (pentobarbital) and perfused with 120 ml normal saline followed by 120 ml paraformaldehyde (PFA) 4%. Brains were removed and stored for 24 h in PFA 4% and then frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . Coronal striatal sections (20  $\mu$ m thickness) were cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica) and thaw-mounted on microscope slides (Superfrost+, Menzel Glaser). Coronal striatal sections were quenched with hydrogen peroxide in 0.1 M PBS and incubated in blocking solution containing normal goat serum (Sigma) in order to block endogenous peroxidase and non-specific binding, respectively. Sections were incubated at RT for 3 h with the primary antibody OX-42 (1:1,000; Serotec) recognising the complement type 3 receptor present on cells of microglial lineage [29] and then incubated at RT for 30 min with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:200, Sigma) the reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma). Slides were washed in 0.1 M PBS, dehydrated and mounted. For quantification of microglial activation, sec-

tions were digitised using a video camera module XC77CE (Sony) associated with a lens AF Micro Nikkor 60 mm (Nikon). For each animal, we used the optical density of OX-42 immunoreactivity on the tissue sections (stained with DAB) to draw ROIs in the corresponding striatum. ROIs were manually defined for each rat over the digitised image by visual inspection on the region showing activated microglia (ROI-1) in the ipsilateral striatum, and symmetrical ROI (ROI-2) was drawn in the homologous contralateral region. The relative optical density of OX-42 immunoreactivity, defined as the ratio of value for an ROI-1 in the right hemisphere to value for the contralateral homologous ROI-2, was measured using Histolab software. At least four matched sections from each animal were used for quantification.

#### Statistical analysis

All data are presented as means  $\pm$  SD. For ex vivo cerebral biodistribution studies, a Student *t* test for unpaired values was used to assess statistical significance of differences between rats pre-injected with PK11195 and control rats; a Student *t* test for paired values was used to assess statistical significance of differences between ipsi- (lesioned) and contralateral (intact) side of the brain. For autoradiography and immunohistochemistry, comparisons were performed using Kruskal–Wallis non-parametric tests. Significance was set at  $p < 0.001$ .

## Results

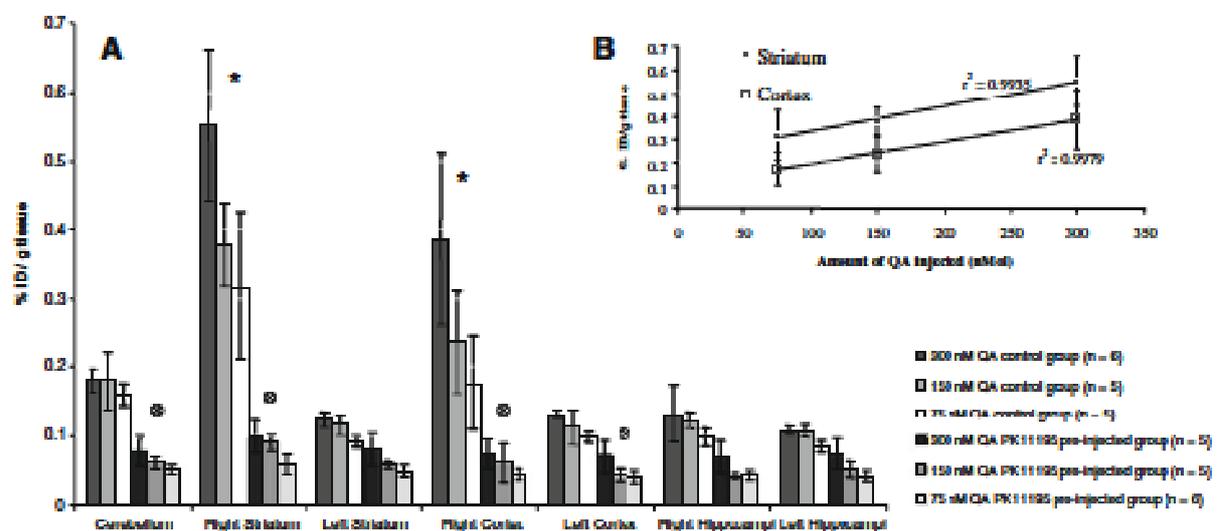
### Ex vivo cerebral biodistribution of [ $^{125}$ I]-CLINDE, blocking studies and ex vivo autoradiography

The cerebral biodistribution of [ $^{125}$ I]-CLINDE in rats lesioned with different amounts of QA was expressed as the radioactivity levels, in percent injected dose per gram of tissue (%ID/g) and shown in Fig. 1a.

In the groups without pre-injection of PK11195 (control groups), the accumulation of [ $^{125}$ I]-CLINDE in the left (intact) side of the brain was low ( $0.084 \pm 0.008$  to  $0.180 \pm 0.017\%$ ID/g tissue) and consistent whatever the cerebral area (cerebellum, striatum, cortex, hippocampus) and the dose of QA injected, with no statistically significant difference between groups.

In the right (lesioned) side of the brain, a significant increase ( $p < 0.001$ ) in the in vivo binding of [ $^{125}$ I]-CLINDE was observed in the striatum for each dose of QA (300 nmol:  $0.552 \pm 0.109\%$ ID/g tissue, i.e. +349% compared with the contralateral side; 150 nmol:  $0.378 \pm 0.059\%$ ID/g tissue, i.e. +229%; 75 nmol:  $0.317 \pm 0.106\%$ ID/g tissue, i.e. +248%).

A significant increase ( $p < 0.001$ ) was also observed in the cortex on the lesioned side for each dose of QA (300 nmol:  $0.385 \pm 0.126\%$ ID/g tissue, +94% compared with contralateral side; 150 nmol:  $0.237 \pm 0.075\%$ ID/g tissue, i.e. +112%; 75 nmol:  $0.176 \pm 0.068$ , i.e. +81%).



**Fig. 1** Brain regional biodistribution (% injected dose/g tissue mean  $\pm$  SEM) of [ $^{125}$ I]-CLINDE and effects of pre-treatment with the TSPO-selective ligand PK11195 (5 mg/kg) on [ $^{125}$ I]-CLINDE binding in selected cerebral regions of rats lesioned in the right striatum with 300, 150 or 75 nmol of quinolinic acid, 30 min after [ $^{125}$ I]-CLINDE i.v.

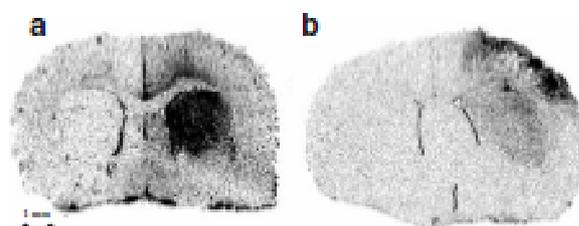
injection (a). \* $p < 0.001$  between lesioned and intact side, *t* test for paired values. @ $p < 0.001$  between rats pre-injected with PK11195 and control rats, *t* test for unpaired values. b The relation between the intensity of QA lesion in the right striatum and [ $^{125}$ I]-CLINDE uptake in ipsilateral striatum and cortex of rats

In the hippocampus, a slight but not statistically significant increase of [ $^{125}$ I]-CLINDE was measured in the lesioned side from each dose of QA.

The result of blocking studies, consisting of a pre-treatment with PK11195 (5 mg/kg) 15 min before the radiotracer, is also presented in Fig. 1a. We observed that this pre-treatment reduced [ $^{125}$ I]-CLINDE uptake in all regions of the brain. The most significant decrease was measured in the ipsilateral striatum and cortex (decreases of 82% and 81%, respectively, in the group of rats lesioned with 300 nmol QA). [ $^{125}$ I]-CLINDE binding was also reduced in rats lesioned with 150 and 75 nmol QA, showing the same profile of inhibition in groups pre-treated with PK11195, with a high decrease of activity in the ipsilateral striatum and cortex (decreases of 76% and 75% for animals lesioned with 150 nmol QA, respectively, and of 82% and 75% for animals lesioned with 75 nmol QA, respectively).

The relation between the intensity of QA lesion in the right striatum and cerebral uptake of radioactivity is presented in Fig. 1b. The accumulation of [ $^{125}$ I]-CLINDE increased with the quantity of administered QA in both ipsilateral striatum and cortex. Regression analysis yielded a significant correlation (striatum:  $r^2=0.9935$ ; cortex:  $r^2=0.9979$ ) between the uptake of radioactivity in the ipsilateral side of both striatum and cortex and the severity of QA lesion.

Ex vivo autoradiographic images, illustrating the striatal and cortical distribution of radioactivity 30 min after [ $^{125}$ I]-CLINDE injection to rats lesioned with 300 nmol QA, are presented in Fig. 2. Autoradiography studies performed on a control rat (Fig. 2a) showed preferential localisation of the activity in the ipsilateral striatum when compared to contralateral side. Moreover, high labelling of [ $^{125}$ I]-CLINDE was also observed on the ipsilateral cortex. In the saturation study (Fig. 2b), pre-treatment with 5 mg/kg of PK11195 prior to [ $^{125}$ I]-CLINDE injection induced a strong decrease of the radioactivity in both cerebral regions.



**Fig. 2** Ex vivo autoradiographic images of [ $^{125}$ I]-CLINDE distribution in striatum and cortex. Coronal sections of control rat striatum (a) and TSPO-selective ligand PK11195 (5 mg/kg) pre-treated rat (b), lesioned with 300 nmol QA, are presented

### In vitro autoradiography with [ $^3$ H]-PK11195

In vitro autoradiographic images, illustrating the striatal specific binding of [ $^3$ H]-PK11195 according to the amount of QA injected, are presented in Fig. 3a. In vitro binding of [ $^3$ H]-PK11195 was low in the intact left striatum ( $77.5 \pm 17.4$  Bq/mg tissue) and more or less equal whatever the degree of QA lesion is. In contrast, this specific binding increased on the lesioned side ( $p < 0.001$ ), following the quantity of QA injected:  $224 \pm 13$ ,  $205 \pm 10$  and  $122 \pm 24$  Bq/mg tissue for 300 ( $n=5$ ), 150 ( $n=4$ ) and 75 nmol QA ( $n=5$ ), respectively.

As shown on Fig. 3b, the [ $^{125}$ I]-CLINDE uptake expressed in percentage of injected dose per gram tissue was related to this specific binding of [ $^3$ H]-PK11195 in the ipsilateral striatum, relative to the contralateral side, for each dose of QA.

### Immunohistochemistry studies

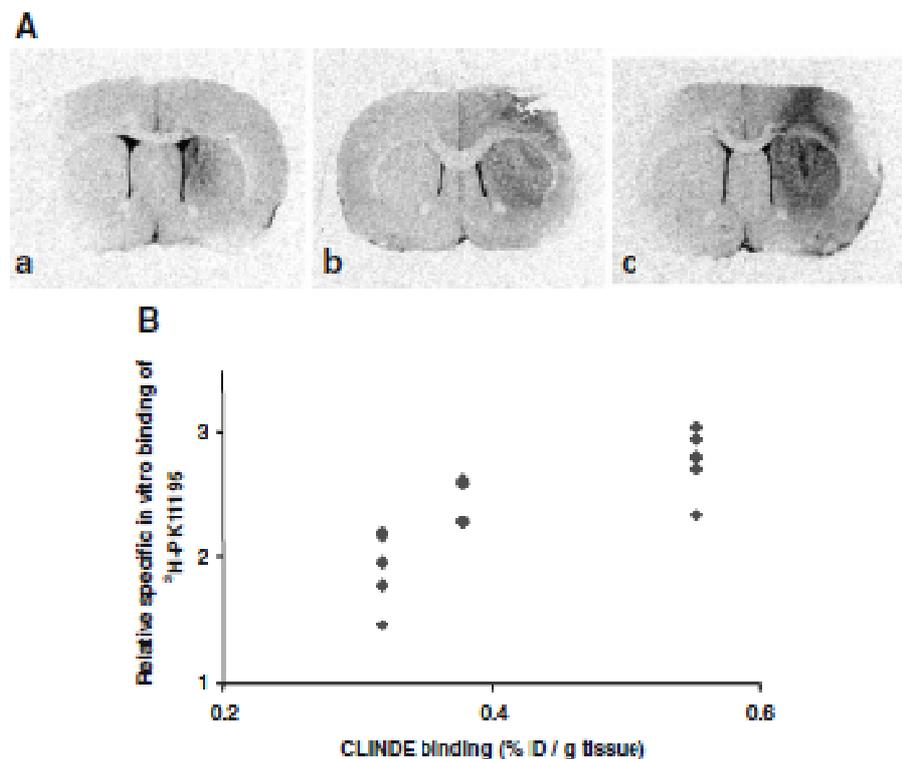
The excitotoxic QA lesions increased significantly ( $p < 0.001$ ) OX-42 immunoreactivity relative to non-lesioned side of the brain (Fig. 4). Evolution of OX-42 immunoreactivity was performed using semi-quantitative measurement of optical density in the striatum. As expected, the dose of QA used to induce excitotoxicity was positively related to the increase of immunoreactivity in the ipsilateral striatum relative to contralateral side [ $295 \pm 62\%$ ,  $239 \pm 36\%$  and  $162 \pm 21\%$  for 300 ( $n=4$ ), 150 ( $n=2$ ) and 75 nmol QA ( $n=2$ ), respectively].

### Discussion

The aim of the present study was to evaluate the recently developed TSPO imidazopyridazine iodinated ligand CLINDE in an animal model of excitotoxicity, and more specifically, to investigate its ability to reflect the level of neuroinflammation. In order to modulate the excitotoxic lesion intensity, we used gradual amounts of QA (75, 150 or 300 nmol). Microglial activation in the ipsilateral striatum was clearly observed using immunohistochemical staining for specific antibody OX-42, in accordance with literature data using rat models of excitotoxic lesions either with QA [30] or  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid [21, 22]. In addition, our results evidenced a positive relation between the intensity of immunohistochemical staining and the dose of QA injected.

In vitro autoradiography using the reference TSPO ligand [ $^3$ H]-PK11195 also showed a marked increase of labelling as previously observed in rat models of excitotoxic lesions [21, 22, 31, 32]. The level of this increase was positively correlated with the dose of QA injected.

**Fig. 3** In vitro autoradiographic images of the specific binding of the TSPO-selective ligand [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 in rats lesioned with different amounts of QA: 75 (a,  $n=5$ ), 150 (b,  $n=4$ ) and 300 nmol (c,  $n=5$ ; **A**) **B** The relation between [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE uptake (percentage of injected dose per gram tissue) and specific binding of [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 in the ipsilateral striatum relative to the contralateral side for each dose of QA injected

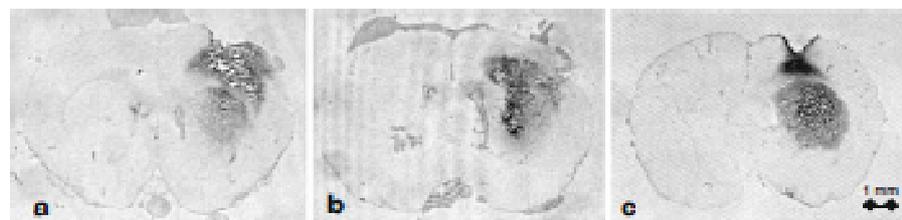


Cerebral biodistribution studies showed that [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE binding in lesioned striatum and cortex, brain areas the most affected by excitotoxicity process, was significantly higher than that in intact side. Moreover, the uptake of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE reflected accurately the changing degree of neuroinflammation (striatum:  $r^2=0.9935$ ; cortex:  $r^2=0.9979$ ). The specific *in vivo* binding of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE to TSPO was assessed by pre-injection of an excess of PK11195 (5 mg/kg) as this treatment decreased the radioactivity uptake of about 75–80% in each group of rats exhibiting different levels of neuroinflammation. The specificity of CLINDE binding that we report here had been previously documented in normal rodents by pre-injection of non-radioactive CLINDE, PK11195 [24] or Ro5-4864 (another TSPO ligand) [27]. *Ex vivo* autoradiography study provided visual evidence that specific binding of [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE to TSPO occurred exclusively in the striatum and cortex ipsilateral to the lesion. The

image revealed an excellent spatial correspondence between CLINDE signal and both activated microglia, as assessed by immunohistochemistry, and TSPO up-regulation, as assessed by autoradiography using [ $^3\text{H}$ ]-PK11195.

An unexpected result in the present work was that the *ex vivo* [ $^{125}\text{I}$ ]-CLINDE binding did not match the *in vitro* [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 one regarding the amount of QA injected in the striatum. This discrepancy may be due to a difference in the respective binding domains of these two tracers to the multimeric protein receptor complex from which 18 kDa TSPO is part. It has been well documented that isoquinoline compounds like PK11195 bind on the 18 kDa TSPO protein itself [33], but other TSPO ligands, such as Ro 5-4864, which is thought to overlap on both TSPO and voltage-dependant anion channel, interact with several parts of the receptor complex. To date, the mechanism of CLINDE binding on TSPO is not precisely known and could be different than PK11195. Although we cannot rule

**Fig. 4** Immunohistochemical staining for CX-42 (marker of microglia) in the striatum of rats lesioned with different amounts of QA: 75 (a,  $n=2$ ), 150 (b,  $n=2$ ) and 300 nmol (c,  $n=4$ )



out this hypothesis, the discrepancy should be more likely due to an experimental variability phenomenon. In the present work, the degree of neuroinflammation was evaluated as the binding ratio of lesioned side to non-lesioned side of the brain. According to our data, the accumulation of [ $^{125}$ I]-CLINDE in the non-lesioned side was rather constant (0.084 to 0.180%ID/g tissue) and similar to that previously reported in normal rat brain (0.18%ID/g tissue, 30 min after tracer injection) [24]. However, a slight but not statistically significant variation in this value (as observed in the left striatum with 75 nmol QA) might modify the binding ratio in a significant way. Then, we assessed both  $r$ -square factor and slope linking up respective CLINDE and PK11195 binding ratios together to the amount of QA injected. We obtained  $r^2=0.896$  and a slope=0.005 for CLINDE and  $r^2=0.944$  and a slope=0.004 for PK11195, suggesting equivalent dose-response relationship properties for both CLINDE and PK11195. Moreover, the pattern of uptake of CLINDE in the cortex was progressive and equivalent than the one obtained in the striatum with [ $^3$ H]-PK11195. Aside from that, the possibility that the aforementioned discrepancy between the ex vivo CLINDE and in vitro PK11195 data may be due to the experimental factor that was strengthened by the fact that a distinct difference exists between in vitro and ex vivo in terms of ligand delivery with blood flow, the ex vivo situation being vulnerable to inaccuracy not encountered in vitro.

The unilateral intrastriatal injection of QA we used here is admitted as an animal model of human Huntington's disease as it reproduces some biochemical, behavioural and pathologic features of the disease in rodents and non-human primates [34, 35]. Aside from that, we demonstrated that the large increase in TSPO up-regulation in the lesioned brain hemisphere was correlated with the intensity of the excitotoxic lesion and that in vivo accumulation of CLINDE was able to discriminate these various degrees of microglial activation. Interestingly, Matner et al. [25] previously described such a quantitative relationship between the amount of CLINDE binding and the clinical severity of the injury in rats exhibiting experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis that has a physiopathological mechanism very different from excitotoxic process. Furthermore, CLINDE has in vitro and metabolic characteristics that allow its use for cerebral molecular imaging, with a good passing across the blood-brain barrier and more than 90% of extracted radioactive material from organs expressing TSPO as unchanged iodinated CLINDE in normal rodents [24, 27, 36–38].

There is to date a considerable interest in the development of selective radiopharmaceuticals for imaging TSPO with PET or SPECT. It is well known that PET imaging

provides functional data with high resolution and allows quantification. Therefore, new PET radioligands aimed at exploring activated microglia are in development. For instance, [ $^{11}$ C]-DPA-713 (pyrazolopyrimidine) and [ $^{11}$ C]-DAA1106/[ $^{18}$ F]-FEDAA1106 (phenoxyphenyl-acetamide) are two promising new ligands that have been both validated not only in rodent models of neuroinflammation [21, 39] but also in non-human [40] or, for the last, in living human brain [41]. According to their respective  $K_d$  values measured in normal rat brain tissue, CLINDE displays an intermediate affinity for TSPO between tritiated DAA1106 and PK-11195 (1.7 nM for CLINDE, 0.4 nM for [ $^3$ H]-DAA1106 and 6.4 nM for [ $^3$ H]-PK11195, [24, 39]. However, this comparison must be considered with precaution since experimental tissue has not been prepared in the same conditions. On the other hand, SPECT is a routine method more convenient in clinical practice, and iodinated CLINDE that accurately express the degree of microglial activation in a wide variety of animal models of neurodegenerative disorders is a potential agent for visualization of neuroinflammation in humans using SPECT.

## Conclusion

CLINDE was radiolabelled with  $^{125}$ I, and its biodistribution was studied in the brain of rats lesioned with gradual amounts of QA, an animal model of excitotoxicity. CLINDE uptake was significantly enhanced in the lesioned striatum and cortex, compared to controls, reflecting the extent of both microglial activation and TSPO up-regulation. Although further clinical studies are required to validate the use of iodinated CLINDE in human subjects, these results strongly suggest a quantitative relationship between the intensity of neuroinflammation and radiotracer binding, making CLINDE an attractive radioiodinated candidate for imaging TSPO with SPECT to explore their involvement in neurodegenerative disorders associated with microglial activation.

**Acknowledgments** All studies were conducted according to the French legislation and European directives. This work was financially supported in part by the EC-FP6-project DiMI, LSHB-CT-2005-511146.

## References

- Papadopoulos V, Bauldi M, Guilaric TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, et al. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:402–9.
- McPhery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the

- voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(3):3170–4.
3. Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, Miral S, et al. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol* 2005;19:588–94.
  4. Lacapere JJ, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 2003;68:569–85.
  5. Sutter AP, Mauser K, Hopfner M, Barthel E, Gmbowski P, Faiss S, et al. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human oesophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2002;102(4):318–27.
  6. Benavides J, Quaronero D, Inhauld F, Mdgouris C, Uzun A, Renaud C, et al. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [<sup>3</sup>H]PK11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 1983;41(6):1744–50.
  7. Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, Syrota A, et al. Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [<sup>11</sup>C]PK11195. *Neurology* 2000;55(7):1052–4.
  8. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 2001;358(9280):461–7.
  9. Papadopoulos V, Lacanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 2006;138(3):749–56.
  10. Banati RB, Newcombe J, Gunn BN, Cagnin A, Turkheimer FE, Heppner F, et al. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* 2000;123:2321–37.
  11. Messner K, Reynolds GP. Increased peripheral benzodiazepine binding sites in the brain of patients with Huntington's disease. *Neurosci Lett* 1998;241(1):53–6.
  12. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 2004;15(3):601–9.
  13. Benavides J, Fage D, Carter C, Scatton B. Peripheral type benzodiazepine binding sites are a sensitive indirect index of neuronal damage. *Brain Res* 1987;421(1–2):167–72.
  14. Vannet S, Lopresti BJ, Wiley CA. The peripheral benzodiazepine receptor (translocator protein 18 kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 2006;80(6):308–22.
  15. Mowinkel E, Reutens D, Becher B, Verge G, Evans A, Owens T, et al. PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 1997;50(2):345–51.
  16. Dumont F, De Vos F, Versijpt J, Jansen HM, Korff J, Dierckx RA, et al. In vivo evaluation in mice and metabolism in blood of human volunteers of [<sup>125</sup>I]iodo-PK11195: a possible single-photon emission tomography tracer for visualization of inflammation. *Eur J Nucl Med* 1999;26(3):194–200.
  17. Shah P, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. Synthesis of the enantiomers of [*N*-methyl-<sup>11</sup>C]PK11195 and comparison of their behaviour as radioligands for PK binding sites in mice. *Nucl Med Biol* 1994;21:573–81.
  18. Bellodi S, Moresco RM, Muzarese M, Biella G, Sarvito F, Simcoelli P, et al. Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo PET imaging of neurodegeneration. *Neurochem Int* 2004;44(6):433–40.
  19. Kropholler MA, Boelhard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Lammensma G, Windhorst AD, et al. Development of a linear kinetic plasma input model for (R)-[<sup>11</sup>C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(7):842–51.
  20. Zhang MR, Kumata E, Maeda J, Haradahira T, Noguchi J, Suham T, et al. *N*-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-*N*-(2-[<sup>125</sup>I]iodo-5-methoxybenzyl)acetamide: a potent iodinated radioligand for the peripheral-type benzodiazepine receptor in brain. *J Med Chem* 2007;50:848–55.
  21. Boutin F, Chauveau F, Thomminax C, Grégoire MC, James ML, Trebossen R, et al. [<sup>11</sup>C]DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med* 2007;48(4):573–81.
  22. Boutin F, Chauveau F, Thomminax C, Kuhnat B, Grégoire MC, Jan S, et al. In vivo imaging of brain lesions with [<sup>11</sup>C]CLINDE, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *Glia* 2007;55:1459–68.
  23. Gulyas E, Haldin C, Van A, Banati RB, Schukin Z, Finnema S, et al. [<sup>11</sup>C]vinpocetine: a prospective peripheral benzodiazepine receptor ligand for primate PET studies. *J Nucl Med* 2005;229:219–23.
  24. Matther F, Mardon K, Katsifis A. Pharmacological evaluation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE: a radiolabeled imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acetamide for the study of peripheral benzodiazepine binding sites (PBBS). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:779–89.
  25. Matther F, Katsifis A, Stajkova M, Balintyne P, Willenborg DO. Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32(5):557–63.
  26. Li T, Fan M, Levin CD, Chen N, Lovitt RB, Hayles MB. Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24(8):1113–21.
  27. Katsifis A, Matther F, Dikic B, Papazian V. Synthesis of substituted [<sup>125</sup>I]imidazo[1,2-*a*]pyridines as potential probes for the study of the peripheral benzodiazepine receptors using SPECT. *Radiochim Acta* 2000;883–4:229–32.
  28. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic; 1986.
  29. Robinson AR, White DM, Mason DW. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies, MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 1986;57:239–47.
  30. Ryu JK, Choi HB, Mc Larnon JG. Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiol Dis* 2005;20:550–61.
  31. Chalou S, Pellevoisin C, Bodard S, Vilar MP, Bernard JC, Guillevain D. Iodinated PK-11195 as an *in vivo* marker of neuronal injury in the lesioned rat brain. *Synapse* 1996;24:334–39.
  32. Price GW, Ahier RG, Hume SP, Myers R, Manjil L, Cremer JE, et al. In vivo binding to peripheral benzodiazepine binding sites in lesioned rat brain: comparison between [<sup>3</sup>H]PK11195 and [<sup>18</sup>F]PK14105 as markers for neuronal damage. *J Neurochem* 1990;55:175–85.
  33. Doble A, Ferris O, Bargevin MC, Manager J, Uzun A, Dubocovich MC, et al. Photoaffinity labelling of peripheral-type benzodiazepine-binding sites. *Mol Pharmacol* 1987;31:42–9.
  34. Schwarz R, Whetsel WO Jr, Mangano RM. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 1983;219(4582):316–8.
  35. Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 1986;321:168–71.
  36. Katsifis A, Matther F, Mardon K, Papazian V, Dikic B. Synthesis and evaluation of [<sup>125</sup>I]imidazo[1,2-*a*]pyridines as potential probes for the study of the peripheral benzodiazepine receptors using SPECT. *J Nucl Med* 1998;39(5):50.

37. Manner F, Papazian V, Chapman J, Katsifis A. Ex vivo pharmacological evaluation of the peripheral benzodiazepine receptor radioligand [ $^{125}$ I]-CLINDE in animal tumour models. *J Lab Comp Radiopharm* 2003;46:59.
38. Katsifis A, Manner F, Chapman J, Izard B, Papazian V, Dikic B, et al. Synthesis and evaluation of [ $^{125}$ I]-labelled peripheral benzodiazepine receptor ligands in tumour bearing rodents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:3163.
39. Veneti S, Lopresti BJ, Wang G, Slagel SL, Mason NS, Mathis CA, et al. A comparison of the high-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligands DAA1106 and (R)-PK11195 in rat models of neuroinflammation: implications for PET imaging of microglial activation. *J Neurochem* 2007;102:2118–31.
40. James ML, Fulton RR, Henderson DJ, Eberl S, Meikle SR, Thomson S, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a novel peripheral benzodiazepine receptor PET radioligand. *Bioorg Med Chem* 2005;13(22):6188–94.
41. Fujimura Y, Ikoma Y, Yasuno F, Sahara T, Ota M, Matsumoto R, et al. Quantitative analyses of [ $^{18}$ F]-FEDAA1106 binding to peripheral benzodiazepine receptors in living human brain. *J Nucl Med* 2006;47:43–50.

## Références bibliographiques

- Abraham H, Somogyvari-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A. 2002. Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Exp Brain Res* 142:131-8
- Amitani M, Zhang MR, Noguchi J, Kumata K, Ito T, et al. 2006. Blood flow dependence of the intratumoral distribution of peripheral benzodiazepine receptor binding in intact mouse fibrosarcoma. *Nucl Med Biol* 33:971-5
- Anderson AN, Pavese N, Edison P, Tai YF, Hammers A, et al. 2007. A systematic comparison of kinetic modelling methods generating parametric maps for [<sup>11</sup>C]-(R)-PK11195. *Neuroimage* 36:28-37
- Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH. 1986. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 261:576-83
- Arlicot N, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, et al. 2008. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2203-11
- Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. 1991. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet* 337:1521-6
- Banati RB, Egensperger R, Maassen A, Hager G, Kreutzberg GW, Graeber MB. 2004. Mitochondria in activated microglia in vitro. *J Neurocytol* 33:535-41
- Banati RB, Goerres GW, Myers R, Gunn RN, Turkheimer FE, et al. 1999. [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography imaging of activated microglia in vivo in Rasmussen's encephalitis. *Neurology* 53:2199-203

- Banati RB, Myers R, Kreutzberg GW. 1997. PK ('peripheral benzodiazepine')--binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [<sup>3</sup>H]PK11195 binding to activated microglia. *J Neurocytol* 26:77-82
- Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer F, et al. 2000. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* 123 ( Pt 11):2321-37
- Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD. 1994. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 38:365-75
- Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. 1991. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 11:1649-59
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-71
- Belloli S, Moresco RM, Matarrese M, Biella G, Sanvito F, et al. 2004. Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo pet imaging of neurodegeneration. *Neurochem Int* 44:433-40
- Benavides J, Quarteronnet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, et al. 1983. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [<sup>3</sup>H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 41:1744-50
- Bergstrom M, Mosskin M, Ericson K, Ehrin E, Thorell JO, et al. 1986. Peripheral benzodiazepine binding sites in human gliomas evaluated with positron emission tomography. *Acta Radiol Suppl* 369:409-11

- Bertram L, Tanzi RE. 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115:1449-57
- Bjorklund H, Olson L, Dahl D, Schwarcz R. 1986. Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res* 371:267-77
- Block F, Schwarcz M. 1994. Expression of GFAP in the striatum and its projection areas in response to striatal quinolinic acid lesion in rats. *Neuroreport* 5:2237-40
- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98
- Bolton SJ, Perry VH. 1998. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. *Exp Neurol* 154:231-40
- Bono F, Lamarche I, Prabonnaud V, Le Fur G, Herbert JM. 1999. Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 265:457-61
- Bourdoiseau M. 1986. Iodine radiochemistry and radiopharmaceutical product labeling. *Int J Rad Appl Instrum B* 13:83-8
- Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Gregoire MC, James ML, et al. 2007a. <sup>11</sup>C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med* 48:573-81
- Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Kuhnast B, Gregoire MC, et al. 2007b. In vivo imaging of brain lesions with [<sup>11</sup>C]CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors. *Glia* 55:1459-68
- Braestrup C, Squires RF. 1977. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (<sup>3</sup>H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3805-9

- Briard E, Hong J, Musachio J, Zoghbi S, Fujita M, et al. 2005. Synthesis and evaluation of two candidate  $^{11}\text{C}$ -labeled radioligands for brain peripheral benzodiazepine receptors. *J Lab Comp Radiopharm* 48:S71
- Briard E, Zoghbi SS, Imaizumi M, Gourley JP, Shetty HU, et al. 2008. Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive  $^{11}\text{C}$ -labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors in vivo. *J Med Chem* 51:17-30
- Brodthmann A, Puce A, Darby D, Donnan G. 2007. fMRI demonstrates diaschisis in the extrastriate visual cortex. *Stroke* 38:2360-3
- Brown AK, Fujita M, Fujimura Y, Liow JS, Stabin M, et al. 2007. Radiation dosimetry and biodistribution in monkey and man of  $^{11}\text{C}$ -PBR28: a PET radioligand to image inflammation. *J Nucl Med* 48:2072-9
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, et al. 2001a. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358:461-7
- Cagnin A, Gerhard A, Banati RB. 2002. In vivo imaging of neuroinflammation. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:581-6
- Cagnin A, Myers R, Gunn RN, Lawrence AD, Stevens T, et al. 2001b. In vivo visualization of activated glia by [ $^{11}\text{C}$ ] (R)-PK11195-PET following herpes encephalitis reveals projected neuronal damage beyond the primary focal lesion. *Brain* 124:2014-27
- Cagnin A, Rossor M, Sampson EL, Mackinnon T, Banati RB. 2004. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 56:894-7
- Camsonne R, Crouzel C, Comar D, Mazière M, Prenant C, Sastre J. 1984. Synthesis of N-( $^{11}\text{C}$ )methyl, N-(methyl-1propyl), (chloro-2 phenyl)-1-isoquinoline carboxamide-3 (PK11195)-a new ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *J Lab Comp Radiopharm* 21:985-91

- Cappelli A, Matarrese M, Moresco RM, Valenti S, Anzini M, et al. 2006. Synthesis, labeling, and biological evaluation of halogenated 2-quinolinecarboxamides as potential radioligands for the visualization of peripheral benzodiazepine receptors. *Bioorg Med Chem* 14:4055-66
- Carmichael ST, Tatsukawa K, Katsman D, Tsuyuguchi N, Kornblum HI. 2004. Evolution of diaschisis in a focal stroke model. *Stroke* 35:758-63
- Casellas P, Galiegue S, Basile AS. 2002. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40:475-86
- Chaki S, Funakoshi T, Yoshikawa R, Okuyama S, Okubo T, et al. 1999. Binding characteristics of [<sup>3</sup>H]DAA1106, a novel and selective ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 371:197-204
- Chalon S, Pellevoisin C, Bodard S, Vilar MP, Besnard JC, Guilloteau D. 1996. Iodinated PK 11195 as an ex vivo marker of neuronal injury in the lesioned rat brain. *Synapse* 24:334-9
- Chao CC, Hu S, Peterson PK. 1995a. Modulation of human microglial cell superoxide production by cytokines. *J Leukoc Biol* 58:65-70
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK. 1995b. Tumor necrosis factor-alpha production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci* 17:97-105
- Charbonneau P, Syrota A, Crouzel C, Valois JM, Prenant C, Crouzel M. 1986. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the living heart characterized by positron emission tomography. *Circulation* 73:476-83
- Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Dolle F, Tavitian B. 2008. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [<sup>11</sup>C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2304-19

- Chauveau F, Van Camp N, Dolle F, Kuhnast B, Hinnen F, et al. 2009. Comparative evaluation of the translocator protein radioligands  $^{11}\text{C}$ -DPA-713,  $^{18}\text{F}$ -DPA-714, and  $^{11}\text{C}$ -PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation. *J Nucl Med* 50:468-76
- Chebib M, Johnston GA. 2000. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 43:1427-47
- Chen MK, Baidoo K, Verina T, Guilarte TR. 2004. Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization. *Brain* 127:1379-92
- Chen MK, Guilarte TR. 2008. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 118:1-17
- Conway EL, Gundlach AL, Craven JA. 1998. Temporal changes in glial fibrillary acidic protein messenger RNA and [ $^3\text{H}$ ]PK11195 binding in relation to imidazoline-I2-receptor and alpha 2-adrenoceptor binding in the hippocampus following transient global forebrain ischaemia in the rat. *Neuroscience* 82:805-17
- Costa E, Guidotti A. 1979. Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19:531-45
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. 1959. Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183:611-2
- Curtis DR, Watkins JC. 1960. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6:117-41
- Danton GH, Dietrich WD. 2003. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:127-36
- De Reuck J, Decoo D, Lemahieu I, Strijckmans K, Goethals P, Van Maele G. 1997. Crossed cerebellar diaschisis after middle cerebral artery infarction. *Clin Neurol Neurosurg* 99:11-6

- De Vos F, Dumont F, Santens P, Slegers G, Dierckx R, De Reuck J. 1999. High-performance liquid chromatographic determination of [<sup>11</sup>C]1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide in mouse plasma and tissue and in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 736:61-6
- de Vries EF. 2006. Imaging of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression: potential use in diagnosis and drug evaluation. *Curr Pharm Des* 12:3847-56
- de Vries EF, Doorduyn J, Dierckx RA, van Waarde A. 2008. Evaluation of [(<sup>11</sup>C)]rofecoxib as PET tracer for cyclooxygenase 2 overexpression in rat models of inflammation. *Nucl Med Biol* 35:35-42
- de Vries EF, van Waarde A, Buursma AR, Vaalburg W. 2003. Synthesis and in vivo evaluation of <sup>18</sup>F-desbromo-DuP-697 as a PET tracer for cyclooxygenase-2 expression. *J Nucl Med* 44:1700-6
- de Vries EF, Vroegh J, Dijkstra G, Moshage H, Elsinga PH, et al. 2004. Synthesis and evaluation of a fluorine-18 labeled antisense oligonucleotide as a potential PET tracer for iNOS mRNA expression. *Nucl Med Biol* 31:605-12
- Debruyne JC, Van Laere KJ, Versijpt J, De Vos F, Eng JK, et al. 2002. Semiquantification of the peripheral-type benzodiazepine ligand [<sup>11</sup>C]PK11195 in normal human brain and application in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg* 102:127-35
- Debruyne JC, Versijpt J, Van Laere KJ, De Vos F, Keppens J, et al. 2003. PET visualization of microglia in multiple sclerosis patients using [<sup>11</sup>C]PK11195. *Eur J Neurol* 10:257-64
- Del Rio Hortega P. 1932. Microglia. In *Cytology and cellular pathology of the nervous system*, ed. P W, pp. 483-534. New York: Hoeber
- Demeurisse G, Verhas M, Capon A. 1991. Remote cortical dysfunction in aphasic stroke patients. *Stroke* 22:1015-20

- Dihne M, Block F. 2001. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 889:165-73
- Dolle F, Luus C, Reynolds A, Kassiou M. 2009. Radiolabelled Molecules for Imaging the Translocator Protein (18 kDa) Using Positron Emission Tomography. *Curr Med Chem* 16:2899-923
- Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RA, James M, Kassiou M, de Vries EF. 2009. [ $^{11}\text{C}$ ]-DPA-713 and [ $^{18}\text{F}$ ]-DPA-714 as new PET tracers for TSPO: a comparison with [ $^{11}\text{C}$ ]-( $\text{R}$ )-PK11195 in a rat model of herpes encephalitis. *Mol Imaging Biol* 11:386-98
- Drugan RC. 1996. Peripheral benzodiazepine receptors: molecular pharmacology to possible physiological significance in stress-induced hypertension. *Clin Neuropharmacol* 19:475-96
- Dumont F, De Vos F, Versijpt J, Jansen HM, Korf J, et al. 1999. In vivo evaluation in mice and metabolism in blood of human volunteers of [ $^{123}\text{I}$ ]iodo-PK11195: a possible single-photon emission tomography tracer for visualization of inflammation. *Eur J Nucl Med* 26:194-200
- Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, et al. 2008. Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [ $^{11}\text{C}$ ]( $\text{R}$ )-PK11195-PET and [ $^{11}\text{C}$ ]PIB-PET study. *Neurobiol Dis* 32:412-9
- Eikelenboom P, Veerhuis R, Familian A, Hoozemans JJ, van Gool WA, Rozemuller AJ. 2008. Neuroinflammation in plaque and vascular beta-amyloid disorders: clinical and therapeutic implications. *Neurodegener Dis* 5:190-3
- Endres CJ, Pomper MG, James M, Uzuner O, Hammoud DA, et al. 2009. Initial evaluation of  $^{11}\text{C}$ -DPA-713, a novel TSPO PET ligand, in humans. *J Nucl Med* 50:1276-82

- Farges R, Joseph-Liauzun E, Shire D, Caput D, Le Fur G, Ferrara P. 1994. Site-directed mutagenesis of the peripheral benzodiazepine receptor: identification of amino acids implicated in the binding site of Ro5-4864. *Mol Pharmacol* 46:1160-7
- Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. 2009. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 8:355-69
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, et al. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-7
- Fetler L, Amigorena S. 2005. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 309:392-3
- Fookes CJ, Pham TQ, Mattner F, Greguric I, Loc'h C, et al. 2008. Synthesis and biological evaluation of substituted [ $^{18}\text{F}$ ]imidazo[1,2-a]pyridines and [ $^{18}\text{F}$ ]pyrazolo[1,5-a]pyrimidines for the study of the peripheral benzodiazepine receptor using positron emission tomography. *J Med Chem* 51:3700-12
- Franklin K, Paxinos G. 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego
- Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Boulouard M. 2006. Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav Neurosci* 120:1285-98
- Fujimura Y, Ikoma Y, Yasuno F, Suhara T, Ota M, et al. 2006. Quantitative analyses of  $^{18}\text{F}$ -FEDAA1106 binding to peripheral benzodiazepine receptors in living human brain. *J Nucl Med* 47:43-50
- Fujimura Y, Zoghbi SS, Simeon FG, Taku A, Pike VW, et al. 2009. Quantification of translocator protein (18 kDa) in the human brain with PET and a novel radioligand, ( $^{18}\text{F}$ )-PBR06. *J Nucl Med* 50:1047-53

- Fujita M, Imaizumi M, Zoghbi SS, Fujimura Y, Farris AG, et al. 2008. Kinetic analysis in healthy humans of a novel positron emission tomography radioligand to image the peripheral benzodiazepine receptor, a potential biomarker for inflammation. *Neuroimage* 40:43-52
- Galiegue S, Jbilo O, Combes T, Bribes E, Carayon P, et al. 1999. Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 274:2938-52
- Galiegue S, Tinel N, Casellas P. 2003. The peripheral benzodiazepine receptor: a promising therapeutic drug target. *Curr Med Chem* 10:1563-72
- Garcia JH, Liu KF, Ye ZR, Gutierrez JA. 1997. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28:2303-9; discussion 10
- Gerhard A, Banati RB, Goerres GB, Cagnin A, Myers R, et al. 2003. [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET imaging of microglial activation in multiple system atrophy. *Neurology* 61:686-9
- Gerhard A, Neumaier B, Elitok E, Glatting G, Ries V, et al. 2000. In vivo imaging of activated microglia using [<sup>11</sup>C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke. *Neuroreport* 11:2957-60
- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, et al. 2006a. In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:404-12
- Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. 2005. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage* 24:591-

- Gerhard A, Trender-Gerhard I, Turkheimer F, Quinn NP, Bhatia KP, Brooks DJ. 2006b. In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 21:89-93
- Gerhard A, Watts J, Trender-Gerhard I, Turkheimer F, Banati RB, et al. 2004. In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in corticobasal degeneration. *Mov Disord* 19:1221-6
- Gildersleeve DL, Van Dort ME, Johnson JW, Sherman PS, Wieland DM. 1996. Synthesis and evaluation of [<sup>123</sup>I]-iodo-PK11195 for mapping peripheral-type benzodiazepine receptors (omega 3) in heart. *Nucl Med Biol* 23:23-8
- Ginsberg MD. 2003. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34:214-23
- Giulian D, Baker TJ, Shih LC, Lachman LB. 1986. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 164:594-604
- Giulian D, Vaca K, Noonan CA. 1990. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 250:1593-6
- Graeber MB, Lopez-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, et al. 1998. The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813:241-53
- Grafton ST. 2000. PET: activation of cerebral blood flow and glucose metabolism. *Adv Neurol* 83:87-103
- Greuter HN, van Ophemert PL, Luurtsema G, van Berckel BN, Franssen EJ, et al. 2005. Optimizing an online SPE-HPLC method for analysis of (R)-[<sup>11</sup>C]1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarb oxamide [(R)-[<sup>11</sup>C]PK11195] and its metabolites in humans. *Nucl Med Biol* 32:307-12

- Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 17:455-61
- Gulyas B, Halldin C, Karlsson P, Chou YH, Swahn CG, et al. 1999. Brain uptake and plasma metabolism of [<sup>11</sup>C]vinpocetine: a preliminary PET study in a cynomolgus monkey. *J Neuroimaging* 9:217-22
- Gulyas B, Halldin C, Sovago J, Sandell J, Cselenyi Z, et al. 2002a. Drug distribution in man: a positron emission tomography study after oral administration of the labelled neuroprotective drug vinpocetine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29:1031-8
- Gulyas B, Halldin C, Vas A, Banati RB, Shchukin E, et al. 2005. [<sup>11</sup>C]vinpocetine: a prospective peripheral benzodiazepine receptor ligand for primate PET studies. *J Neurol Sci* 229-230:219-23
- Gulyas B, Vas A, Halldin C, Sovago J, Sandell J, et al. 2002b. Cerebral uptake of [ethyl-<sup>11</sup>C]vinpocetine and 1-[<sup>11</sup>C]ethanol in cynomolgous monkeys: a comparative preclinical PET study. *Nucl Med Biol* 29:753-9
- Haelewyn B, Yvon A, Hanouz JL, MacKenzie ET, Ducouret P, et al. 2003. Desflurane affords greater protection than halothane against focal cerebral ischaemia in the rat. *Br J Anaesth* 91:390-6
- Han Z, Slack RS, Li W, Papadopoulos V. 2003. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. *J Recept Signal Transduct Res* 23:225-38
- Hara H, Harada K, Sukamoto T. 1993. Chronological atrophy after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 618:251-60

- Henkel K, Karitzky J, Schmid M, Mader I, Glatting G, et al. 2004. Imaging of activated microglia with PET and [<sup>11</sup>C]PK 11195 in corticobasal degeneration. *Mov Disord* 19:817-21
- Herholz K. 2003. PET studies in dementia. *Ann Nucl Med* 17:79-89
- Herve D, Molko N, Pappata S, Buffon F, LeBihan D, et al. 2005. Longitudinal thalamic diffusion changes after middle cerebral artery infarcts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:200-5
- Hirouchi Y, Suzuki E, Mitsuoka C, Jin H, Kitajima S, et al. 2007. Neuroimaging and histopathological evaluation of delayed neurological damage produced by artificial occlusion of the middle cerebral artery in Cynomolgus monkeys: establishment of a monkey model for delayed cerebral ischemia. *Exp Toxicol Pathol* 59:9-16
- Hirsch JD, Beyer CF, Malkowitz L, Beer B, Blume AJ. 1989. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. *Mol Pharmacol* 35:157-63
- Hirsch T, Decaudin D, Susin SA, Marchetti P, Larochette N, et al. 1998. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 241:426-34
- Hirsch T, Marzo I, Kroemer G. 1997. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep* 17:67-76
- Hirvonen J, Roivainen A, Virta J, Helin S, Nagren K, Rinne JO. 2009. Human biodistribution and radiation dosimetry of (<sup>11</sup>C)-(R)-PK11195, the prototypic PET ligand to image inflammation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*
- Hossmann KA. 1998. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* 39:106-20

- Ikoma Y, Yasuno F, Ito H, Suhara T, Ota M, et al. 2007. Quantitative analysis for estimating binding potential of the peripheral benzodiazepine receptor with [ $^{11}\text{C}$ ]DAA1106. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:173-84
- Imaizumi M, Briard E, Zoghbi SS, Gourley JP, Hong J, et al. 2008. Brain and whole-body imaging in nonhuman primates of [ $^{11}\text{C}$ ]PBR28, a promising PET radioligand for peripheral benzodiazepine receptors. *Neuroimage* 39:1289-98
- Imaizumi M, Briard E, Zoghbi SS, Gourley JP, Hong J, et al. 2007a. Kinetic evaluation in nonhuman primates of two new PET ligands for peripheral benzodiazepine receptors in brain. *Synapse* 61:595-605
- Imaizumi M, Kim HJ, Zoghbi SS, Briard E, Hong J, et al. 2007b. PET imaging with [ $^{11}\text{C}$ ]PBR28 can localize and quantify upregulated peripheral benzodiazepine receptors associated with cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett* 411:200-5
- Jack CR, Jr., Slomkowski M, Gracon S, Hoover TM, Felmlee JP, et al. 2003. MRI as a biomarker of disease progression in a therapeutic trial of milameline for AD. *Neurology* 60:253-60
- James ML, Fulton RR, Henderson DJ, Eberl S, Meikle SR, et al. 2005. Synthesis and in vivo evaluation of a novel peripheral benzodiazepine receptor PET radioligand. *Bioorg Med Chem* 13:6188-94
- James ML, Fulton RR, Vercoullie J, Henderson DJ, Garreau L, et al. 2008. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J Nucl Med* 49:814-22
- James ML, Selleri S, Kassiou M. 2006. Development of ligands for the peripheral benzodiazepine receptor. *Curr Med Chem* 13:1991-2001

- Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, et al. 2005. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol* 19:588-94
- Jander S, Schroeter M, Saleh A. 2007. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke* 38:642-5
- Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. 2006. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv Pharmacol* 54:285-316
- Jorda EG, Jimenez A, Verdaguer E, Canudas AM, Folch J, et al. 2005. Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. *Apoptosis* 10:91-104
- Junck L, Olson JM, Ciliax BJ, Koeppe RA, Watkins GL, et al. 1989. PET imaging of human gliomas with ligands for the peripheral benzodiazepine binding site. *Ann Neurol* 26:752-8
- Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M. 2008. MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 39:1541-7
- Katsifis A, Mattner F, Dikic B, Papazian V. 2000a. Synthesis of substituted [<sup>123</sup>I]imidazo[1,2-a]pyridines as potential probes for the study of the peripheral benzodiazepine receptors using SPECT. *Radiochim Acta* 88:229–32
- Katsifis A, Mattner F, Mardon K, Najdovski L, Dikic B, Kassiou M. 1997. Synthesis and evaluation of an [<sup>123</sup>I]iodo-imidazo[1,2-a]pyridine as potential tracer for the study of the mitochondrial benzodiazepine receptor using SPECT. *J Lab Comp Radiopharm* 40:620-2

- Katsifis A, Mattner F, Zhang Z, Dikic B, Papazian V. 2000b. Synthesis of [<sup>123</sup>I]N',N'-dimethyl-6-methyl-(4'-iodophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide for the study of benzodiazepine receptors using SPECT. *J Label Comp Radiopharm* 43:385-94
- Kloss CU, Thomassen N, Fesl G, Martens KH, Yousri TA, Hamann GF. 2002. Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol Res* 24:713-8
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. 1986. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8:1-8
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-8
- Kriz J, Lalancette-Hebert M. 2009. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 117:497-509
- Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, Folkersma H, van Berckel BN, Lammertsma AA. 2006. Evaluation of reference tissue models for the analysis of [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1431-41
- Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Luurtsema G, et al. 2005. Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[<sup>11</sup>C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:842-51
- Krueger KE. 1995. Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors. *Biochim Biophys Acta* 1241:453-70
- Krueger KE, Papadopoulos V. 1990. Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 265:15015-22

- Krueger KE, Papadopoulos V. 1992. Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:211-37
- Kuge Y, Katada Y, Shimonaka S, Temma T, Kimura H, et al. 2006. Synthesis and evaluation of radioiodinated cyclooxygenase-2 inhibitors as potential SPECT tracers for cyclooxygenase-2 expression. *Nucl Med Biol* 33:21-7
- Kuhlmann AC, Guilarte TR. 2000. Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *J Neurochem* 74:1694-704
- Kumar A, Chugani HT, Luat A, Asano E, Sood S. 2008. Epilepsy surgery in a case of encephalitis: use of  $^{11}\text{C}$ -PK11195 positron emission tomography. *Pediatr Neurol* 38:439-42
- Lacapere JJ, Papadopoulos V. 2003. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68:569-85
- Langen KJ, Salber D, Hamacher K, Stoffels G, Reifenberger G, et al. 2007. Detection of secondary thalamic degeneration after cortical infarction using cis-4- $^{18}\text{F}$ -fluoro-D-proline. *J Nucl Med* 48:1482-91
- Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, Imbault F, Flamier A, et al. 1983. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life Sci* 32:1839-47
- Le Pogam A, Vercouillie J, Corcia P, Praline J, Guilloteau D, et al. 2008. Preliminary results of PET with [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 in humans for detection of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *World Molecular Imaging Congress*. Nice (France)
- Lee BY, Newberg AB, Liebeskind DS, Kung J, Alavi A. 2004. FDG-PET findings in patients with suspected encephalitis. *Clin Nucl Med* 29:620-5

- Lehmann J, Weizman R, Pryce CR, Leschiner S, Allmann I, et al. 1999. Peripheral benzodiazepine receptors in cerebral cortex, but not in internal organs, are increased following inescapable stress and subsequent avoidance/escape shuttle-box testing. *Brain Res* 851:141-7
- Lockhart A, Davis B, Matthews JC, Rahmoune H, Hong G, et al. 2003. The peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 binds with high affinity to the acute phase reactant alpha1-acid glycoprotein: implications for the use of the ligand as a CNS inflammatory marker. *Nucl Med Biol* 30:199-206
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91
- Loos M, Dihne M, Block F. 2003. Tumor necrosis factor-alpha expression in areas of remote degeneration following middle cerebral artery occlusion of the rat. *Neuroscience* 122:373-80
- Lorincz C, Szasz K, Kisfaludy L. 1976. The synthesis of ethyl apovincamate. *Arzneimittelforschung* 26:1907
- Maaser K, Grabowski P, Sutter AP, Hopfner M, Foss HD, et al. 2002. Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 8:3205-9
- Macrae IM, Carswell HV. 2006. Oestrogen and stroke: the potential for harm as well as benefit. *Biochem Soc Trans* 34:1362-5
- Maeda J, Higuchi M, Inaji M, Ji B, Haneda E, et al. 2007a. Phase-dependent roles of reactive microglia and astrocytes in nervous system injury as delineated by imaging of peripheral benzodiazepine receptor. *Brain Res* 1157:100-11
- Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, et al. 2007b. Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living

- mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* 27:10957-68
- Maeda J, Suhara T, Zhang MR, Okauchi T, Yasuno F, et al. 2004. Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [<sup>11</sup>C]DAA1106 for PET: an imaging tool for glial cells in the brain. *Synapse* 52:283-91
- Majo VJ, Prabhakaran J, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Kumar JS. 2005. A general method for the synthesis of aryl [<sup>11</sup>C]methylsulfones: potential PET probes for imaging cyclooxygenase-2 expression. *Bioorg Med Chem Lett* 15:4268-71
- Martin A, Boisgard R, Theze B, Van Camp N, Kuhnast B, et al. 2009. Evaluation of the PBR/TSPO radioligand [<sup>18</sup>F]DPA-714 in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*
- Martin WR, Powers WJ, Raichle ME. 1987. Cerebral blood volume measured with inhaled C<sup>15</sup>O and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:421-6
- Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, et al. 2005. Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* 64:129-31
- Matarrese M, Moresco RM, Cappelli A, Anzini M, Vomero S, et al. 2001. Labeling and evaluation of N-[<sup>11</sup>C]methylated quinoline-2-carboxamides as potential radioligands for visualization of peripheral benzodiazepine receptors. *J Med Chem* 44:579-85
- Mattner F, Katsifis A, Staykova M, Ballantyne P, Willenborg DO. 2005. Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:557-63

- Mattner F, Mardon K, Katsifis A. 2008. Pharmacological evaluation of [<sup>123</sup>I]-CLINDE: a radioiodinated imidazopyridine-3-acetamide for the study of peripheral benzodiazepine binding sites (PBBS). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:779-89
- Mattner F, Mardon K, Loc'h C, Katsifis A. 2006. Pharmacological evaluation of an [<sup>123</sup>I] labelled imidazopyridine-3-acetamide for the study of benzodiazepine receptors. *Life Sci* 79:287-94
- McCarthy TJ, Sheriff AU, Graneto MJ, Talley JJ, Welch MJ. 2002. Radiosynthesis, in vitro validation, and in vivo evaluation of <sup>18</sup>F-labeled COX-1 and COX-2 inhibitors. *J Nucl Med* 43:117-24
- McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3170-4
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. 1988a. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-91
- McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. 1988b. Occurrence of HLA-DR reactive microglia in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 540:319-23
- Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. 1992. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23:552-9
- Miccoli L, Oudard S, Beurdeley-Thomas A, Dutrillaux B, Poupon MF. 1999. Effect of 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide (PK11195), a specific ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, on the lipid fluidity of mitochondria in human glioma cells. *Biochem Pharmacol* 58:715-21
- Minghetti L, Levi G. 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 54:99-125

- Miyai I, Blau AD, Reding MJ, Volpe BT. 1997. Patients with stroke confined to basal ganglia have diminished response to rehabilitation efforts. *Neurology* 48:95-101
- Miyoshi M, Ito H, Arakawa R, Takahashi H, Takano H, et al. 2009. Quantitative analysis of peripheral benzodiazepine receptor in the human brain using PET with (<sup>11</sup>C)-AC-5216. *J Nucl Med* 50:1095-101
- Moresco RM, Lavazza T, Belloli S, Lecchi M, Pezzola A, et al. 2008. Quinolinic acid induced neurodegeneration in the striatum: a combined in vivo and in vitro analysis of receptor changes and microglia activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:704-15
- Morgan D, Gordon MN, Tan J, Wilcock D, Rojiani AM. 2005. Dynamic complexity of the microglial activation response in transgenic models of amyloid deposition: implications for Alzheimer therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:743-53
- Muhleisen H, Gehrman J, Meyermann R. 1995. Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21:505-17
- Myers R, Manjil LG, Cullen BM, Price GW, Frackowiak RS, Cremer JE. 1991a. Macrophage and astrocyte populations in relation to [<sup>3</sup>H]PK 11195 binding in rat cerebral cortex following a local ischaemic lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:314-22
- Myers R, Manjil LG, Frackowiak RS, Cremer JE. 1991b. [<sup>3</sup>H]PK 11195 and the localisation of secondary thalamic lesions following focal ischaemia in rat motor cortex. *Neurosci Lett* 133:20-4
- Nagasawa H, Kogure K. 1990. Exo-focal postischemic neuronal death in the rat brain. *Brain Res* 524:196-202
- Nighoghossian N, Wiart M, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, et al. 2007. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke* 38:303-7

- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-8
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17:2746-55
- Okello A, Edison P, Archer HA, Turkheimer FE, Kennedy J, et al. 2009. Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: a PET study. *Neurology* 72:56-62
- Okuyama S, Chaki S, Yoshikawa R, Ogawa S, Suzuki Y, et al. 1999. Neuropharmacological profile of peripheral benzodiazepine receptor agonists, DAA1097 and DAA1106. *Life Sci* 64:1455-64
- Oliff HS, Weber E, Miyazaki B, Marek P. 1995. Infarct volume varies with rat strain and vendor in focal cerebral ischemia induced by transcranial middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 699:329-31
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, et al. 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57:168-75
- Papadopoulos V. 1993. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14:222-40
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, et al. 2006a. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27:402-9
- Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX. 2006b. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 138:749-56

- Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, et al. 2000. Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [<sup>11</sup>C]PK1195. *Neurology* 55:1052-4
- Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, et al. 2006. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology* 66:1638-43
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. . New York
- Perry VH, Gordon S. 1991. Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125:203-44
- Piani D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A. 1992. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol* 22:2429-36
- Pike VW, Halldin C, Crouzel C, Barre L, Nutt DJ, et al. 1993. Radioligands for PET studies of central benzodiazepine receptors and PK (peripheral benzodiazepine) binding sites-current status. *Nucl Med Biol* 20:503-25
- Pimlott SL, Stevenson L, Wyper DJ, Sutherland A. 2008. Rapid and efficient radiosynthesis of [<sup>123</sup>I]I-PK11195, a single photon emission computed tomography tracer for peripheral benzodiazepine receptors. *Nucl Med Biol* 35:537-42
- Politis M, Pavese N, Tai YF, Tabrizi SJ, Barker RA, Piccini P. 2008. Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study. *Brain* 131:2860-9
- Pomper MG, Musachio JL, Scheffel U, Macdonald JE, McCarthy DJ, et al. 2000. Radiolabeled neuronal nitric oxide synthase inhibitors: synthesis, in vivo evaluation, and primate PET studies. *J Nucl Med* 41:1417-25

- Price CJ, Wang D, Menon DK, Guadagno JV, Cleij M, et al. 2006. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke* 37:1749-53
- Price GW, Ahier RG, Hume SP, Myers R, Manjil L, et al. 1990. In vivo binding to peripheral benzodiazepine binding sites in lesioned rat brain: comparison between [<sup>3</sup>H]PK11195 and [<sup>18</sup>F]PK14105 as markers for neuronal damage. *J Neurochem* 55:175-85
- Probst KC, Izquierdo D, Bird JL, Brichard L, Franck D, et al. 2007. Strategy for improved [(<sup>11</sup>C)]DAA1106 radiosynthesis and in vivo peripheral benzodiazepine receptor imaging using microPET, evaluation of [(<sup>11</sup>C)]DAA1106. *Nucl Med Biol* 34:439-46
- Raghavendra Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Dempsey RJ. 2000. Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Exp Neurol* 161:102-14
- Ramsay SC, Weiller C, Myers R, Cremer JE, Luthra SK, et al. 1992. Monitoring by PET of macrophage accumulation in brain after ischaemic stroke. *Lancet* 339:1054-5
- Rao VL, Butterworth RF. 1997. Characterization of binding sites for the omega3 receptor ligands [<sup>3</sup>H]PK11195 and [<sup>3</sup>H]RO5-4864 in human brain. *Eur J Pharmacol* 340:89-99
- Rasmussen T, Andermann F. 1991. Rasmussen's syndrome: symptomatology of the syndrome of chronic encephalitis and seizures: 35-year experience with 51 cases. . In *Epilepsy surgery*, ed. L H, pp. 173–82. New York: Raven Press
- Revital S, Hagai B, Gadi G. 2008. Evidence for the coexistence of segregated and integrated functional connections from the striatum to the substantia nigra in rats. *Neuroimage* 40:451-7
- Rey C, Mauduit C, Naureils O, Benahmed M, Louisot P, Gasnier F. 2000. Up-regulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by tumor necrosis factor

- alpha in testicular leydig cells. Possible involvement in cell survival. *Biochem Pharmacol* 60:1639-46
- Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi M, Biondi A, et al. 1989. Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 19:1443-8
- Robinson AP, White TM, Mason DW. 1986. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 57:239-47
- Rojas S, Martin A, Arranz MJ, Pareto D, Purroy J, et al. 2007. Imaging brain inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and induction of the peripheral-type benzodiazepine receptor after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1975-86
- Rojo LE, Fernandez JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB. 2008. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 39:1-16
- Rudin M, Weissleder R. 2003. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2:123-31
- Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C. 1998. Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol* 96:172-8
- Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG. 2005. Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiol Dis* 20:550-61
- Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ. 2005. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 51:241-53

- Scheid R, Lincke T, Voltz R, von Cramon DY, Sabri O. 2004. Serial  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and magnetic resonance imaging of paraneoplastic limbic encephalitis. *Arch Neurol* 61:1785-9
- Schroeter M, Dennin MA, Walberer M, Backes H, Neumaier B, et al. 2009. Neuroinflammation extends brain tissue at risk to vital peri-infarct tissue: a double tracer [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195- and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET study. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1216-25
- Schwarcz R, Whetsell WO, Jr., Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-8
- Selleri S, Bruni F, Costagli C, Costanzo A, Guerrini G, et al. 2001. 2-Arylpirazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 9:2661-71
- Sette G, Baron JC, Young AR, Miyazawa H, Tillet I, et al. 1993. In vivo mapping of brain benzodiazepine receptor changes by positron emission tomography after focal ischemia in the anesthetized baboon. *Stroke* 24:2046-57; discussion 57-8
- Shah F, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. 1994. Synthesis of the enantiomers of [N-methyl- $^{11}\text{C}$ ]PK 11195 and comparison of their behaviours as radioligands for PK binding sites in rats. *Nucl Med Biol* 21:573-81
- Shah F, Pike V, Turton DR. 1993. Synthesis of homochiral  $^{11}\text{C}$ -labelled radioligands for peripheral benzodiazepine binding sites. *J Lab Comp Radiopharm* 32:166-8
- Shidahara M, Ikoma Y, Seki C, Fujimura Y, Naganawa M, et al. 2008. Wavelet denoising for voxel-based compartmental analysis of peripheral benzodiazepine receptors with ( $^{18}\text{F}$ )F-FEDAA1106. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:416-23

- Shoshan-Barmatz V, Gincel D. 2003. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* 39:279-92
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-66
- Stephenson DT, Schober DA, Smalstig EB, Mincy RE, Gehlert DR, Clemens JA. 1995. Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 15:5263-74
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56:149-71
- Stone TW. 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* 64:185-218
- Sutter AP, Maaser K, Grabowski P, Bradacs G, Vormbrock K, et al. 2004. Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells and enhance chemosensitivity to paclitaxel, docetaxel, doxorubicin and the Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J Hepatol* 41:799-807
- Tamagnan G. 2008. Use of exploratory IND for early phase clinical trials using PET or SPECT imaging. *World Molecular Imaging Congress*. Nice (France)
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60
- Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, et al. 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5473-8

- Thominiaux C, Dolle F, James ML, Bramouille Y, Boutin H, et al. 2006. Improved synthesis of the peripheral benzodiazepine receptor ligand [ $^{11}\text{C}$ ]DPA-713 using [ $^{11}\text{C}$ ]methyl triflate. *Appl Radiat Isot* 64:570-3
- Thominiaux C, Mattner F, Greguric I, Boutin H, Chauveau F, et al. 2007. Radiosynthesis of 2-[6-chloro-2-(4-iodophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]-N-ethyl-N-[ $^{11}\text{C}$ ]methylacetamide, [ $^{11}\text{C}$ ]CLINME, a novel radioligand for imaging the peripheral benzodiazepine receptors with PET. *J Label Comp Radiopharm* 50:229-36
- Tomasi G, Bertoldo A, Cobelli C. 2009. PET parametric imaging improved by global-two-stage method. *Ann Biomed Eng* 37:419-27
- Tomasi G, Edison P, Bertoldo A, Roncaroli F, Singh P, et al. 2008. Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of  $^{11}\text{C}$ -(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 49:1249-56
- Topper R, Gehrman J, Schwarz M, Block F, Noth J, Kreutzberg GW. 1993. Remote microglial activation in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 123:271-83
- Trapani G, Franco M, Ricciardi L, Latrofa A, Genchi G, et al. 1997. Synthesis and binding affinity of 2-phenylimidazo[1,2- $\alpha$ ]pyridine derivatives for both central and peripheral benzodiazepine receptors. A new series of high-affinity and selective ligands for the peripheral type. *J Med Chem* 40:3109-18
- Trincavelli ML, Marselli L, Falleni A, Gremigni V, Ragge E, et al. 2002. Upregulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by cytokine-induced damage of human pancreatic islets. *J Cell Biochem* 84:636-44
- Turkheimer FE, Edison P, Pavese N, Roncaroli F, Anderson AN, et al. 2007. Reference and target region modeling of [ $^{11}\text{C}$ ]- (R)-PK11195 brain studies. *J Nucl Med* 48:158-67

- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, et al. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [ $^{11}\text{C}$ ](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15:601-9
- Turton DR, Pike V, Cartoon M, Widdowson D. 1984. Preparation of a potential marker for glial cells (N-methyl- $^{11}\text{C}$ )Ro5-4864. *J Lab Comp Radiopharm* 21:1209-10
- Tzeng SF, Hsiao HY, Mak OT. 2005. Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:335-40
- van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitmaker A, et al. 2008. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* 64:820-2
- van Camp N, Chauveau F, Jego B, Siquier-Pernet K, Grégoire M, et al. 2008. Evaluation of [ $^{18}\text{F}$ ]PBR111 in a Rat Model of Neuroinflammation: A New Radiotracer for the TSPO 18kd (Peripheral Benzodiazepine Receptor). *World Molecular Imaging Congress*. Nice (France)
- van Sorge AA, van Etten RJ, Rehmann CJ, Rijnders TJ, van Haeringen NJ. 2002.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -diflunisal and the human iris: topical application reveals localization. *J Ocul Pharmacol Ther* 18:185-95
- Vas A, Shchukin Y, Karrenbauer VD, Cselenyi Z, Kostulas K, et al. 2008. Functional neuroimaging in multiple sclerosis with radiolabelled glia markers: preliminary comparative PET studies with [ $^{11}\text{C}$ ]vinpocetine and [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 in patients. *J Neurol Sci* 264:9-17
- Veiga S, Carrero P, Pernia O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2007. Translocator protein 18 kDa is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia* 55:1426-36
- Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Slagel SL, Mason NS, et al. 2007a. A comparison of the high-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligands DAA1106 and (R)-PK11195

- in rat models of neuroinflammation: implications for PET imaging of microglial activation. *J Neurochem* 102:2118-31
- Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. 2006. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 80:308-22
- Venneti S, Wagner AK, Wang G, Slagel SL, Chen X, et al. 2007b. The high affinity peripheral benzodiazepine receptor ligand DAA1106 binds specifically to microglia in a rat model of traumatic brain injury: implications for PET imaging. *Exp Neurol* 207:118-27
- Versijpt J, Debruyne JC, Van Laere KJ, De Vos F, Keppens J, et al. 2005. Microglial imaging with positron emission tomography and atrophy measurements with magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: a correlative study. *Mult Scler* 11:127-34
- Versijpt JJ, Dumont F, Van Laere KJ, Decoo D, Santens P, et al. 2003. Assessment of neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer's disease with radiolabelled PK11195 and single photon emission computed tomography. A pilot study. *Eur Neurol* 50:39-47
- Von Monakow C. 1906. Aphasie und diaschisis. *Neurol. Centralbl.* 25:1026-38
- Vowinckel E, Reutens D, Becher B, Verge G, Evans A, et al. 1997. PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 50:345-53
- Walker FO. 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369:218-28
- Wang M, Gao M, Hutchins GD, Zheng QH. 2009a. Synthesis of [<sup>11</sup>C]FEDAA1106 as a new PET imaging probe of peripheral benzodiazepine receptor expression. *Eur J Med Chem* 44:2748-53

- Wang M, Yoder KK, Gao M, Mock BH, Xu XM, et al. 2009b. Fully automated synthesis and initial PET evaluation of [ $^{11}\text{C}$ ]PBR28. *Bioorg Med Chem Lett* 19:5636-9
- Watanabe Y, Nakano T, Yutani K, Nishimura H, Kusuoka H, et al. 2000. Detection of viable cortical neurons using benzodiazepine receptor imaging after reversible focal ischaemia in rats: comparison with regional cerebral blood flow. *Eur J Nucl Med* 27:308-13
- Weissleder R, Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radiology* 219:316-33
- Weissman BA, Bolger GT, Isaac L, Paul SM, Skolnick P. 1984. Characterization of the binding of [ $^3\text{H}$ ]Ro 5-4864, a convulsant benzodiazepine, to guinea pig brain. *J Neurochem* 42:969-75
- Weissman BA, Raveh L. 2003. Peripheral benzodiazepine receptors: on mice and human brain imaging. *J Neurochem* 84:432-7
- Wendler G, Lindemann P, Lacapere JJ, Papadopoulos V. 2003. Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR. *Biochem Biophys Res Commun* 311:847-52
- Wiley CA, Lopresti BJ, Venetis S, Price J, Klunk WE, et al. 2009. Carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B and carbon 11-labeled (R)-PK11195 positron emission tomographic imaging in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66:60-7
- Wilson AA, Garcia A, Parkes J, McCormick P, Stephenson KA, et al. 2008. Radiosynthesis and initial evaluation of [ $^{18}\text{F}$ ]-FEPPA for PET imaging of peripheral benzodiazepine receptors. *Nucl Med Biol* 35:305-14
- Wuest F, Kniess T, Bergmann R, Pietzsch J. 2008. Synthesis and evaluation in vitro and in vivo of a  $^{11}\text{C}$ -labeled cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor. *Bioorg Med Chem* 16:7662-70

- Wust FR, Hohne A, Metz P. 2005. Synthesis of  $^{18}\text{F}$ -labelled cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors via Stille reaction with 4- $^{18}\text{F}$ fluoriodobenzene as radiotracers for positron emission tomography (PET). *Org Biomol Chem* 3:503-7
- Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, et al. 1997. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 3:997-1004
- Yamasaki T, Kumata K, Yanamoto K, Hatori A, Takei M, et al. 2009. Imaging of peripheral-type benzodiazepine receptor in tumor: in vitro binding and in vivo biodistribution of N-benzyl-N- $^{11}\text{C}$ methyl-2-(7-methyl-8-oxo-2-phenyl-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)acetamide. *Nucl Med Biol* 36:801-9
- Yanamoto K, Yamasaki T, Kumata K, Yui J, Odawara C, et al. 2009. Evaluation of N-benzyl-N- $^{11}\text{C}$ methyl-2-(7-methyl-8-oxo-2-phenyl-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)acetamide ( $^{11}\text{C}$ DAC) as a novel translocator protein (18 kDa) radioligand in kainic acid-lesioned rat. *Synapse* 63:961-71
- Yanamoto K, Zhang MR, Kumata K, Hatori A, Okada M, Suzuki K. 2007. In vitro and ex vivo autoradiography studies on peripheral-type benzodiazepine receptor binding using  $^{11}\text{C}$ AC-5216 in normal and kainic acid-lesioned rats. *Neurosci Lett* 428:59-63
- Yang DJ, Bryant J, Chang JY, Mendez R, Oh CS, et al. 2004. Assessment of cyclooxygenase-2 expression with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled celebrex. *Anticancer Drugs* 15:255-63
- Yaqub M, Boellaard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Lammertsmae AA. 2008. Impact of wavelet based denoising of  $^{11}\text{C}$ (R)-PK11195 time activity curves on accuracy and precision of kinetic analysis. *Med Phys* 35:5069-78
- Yasuno F, Ota M, Kosaka J, Ito H, Higuchi M, et al. 2008. Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by positron emission tomography with  $^{11}\text{C}$ DAA1106. *Biol Psychiatry* 64:835-41

- Yermakova A, O'Banion MK. 2000. Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders. *Curr Pharm Des* 6:1755-76
- Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, et al. 1988. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241:981-3
- Yu W, Wang E, Voll RJ, Miller AH, Goodman MM. 2008. Synthesis, fluorine-18 radiolabeling, and in vitro characterization of 1-iodophenyl-N-methyl-N-fluoroalkyl-3-isoquinoline carboxamide derivatives as potential PET radioligands for imaging peripheral benzodiazepine receptor. *Bioorg Med Chem* 16:6145-55
- Zaleska MM, Mercado ML, Chavez J, Feuerstein GZ, Pangalos MN, Wood A. 2009. The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology* 56:329-41
- Zhang J, McCarthy TJ, Moore WM, Currie MG, Welch MJ. 1996. Synthesis and evaluation of two positron-labeled nitric oxide synthase inhibitors, S-[<sup>11</sup>C]methylisothiourea and S-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)isothiourea, as potential positron emission tomography tracers. *J Med Chem* 39:5110-8
- Zhang J, Xu M, Dence CS, Sherman EL, McCarthy TJ, Welch MJ. 1997. Synthesis, in vivo evaluation and PET study of a carbon-11-labeled neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor S-methyl-L-thiocitrulline. *J Nucl Med* 38:1273-8
- Zhang MR, Kida T, Noguchi J, Furutsuka K, Maeda J, et al. 2003a. [<sup>11</sup>C]DAA1106: radiosynthesis and in vivo binding to peripheral benzodiazepine receptors in mouse brain. *Nucl Med Biol* 30:513-9
- Zhang MR, Kumata K, Maeda J, Haradahira T, Noguchi J, et al. 2007a. N-(5-Fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-[(<sup>131</sup>I]iodo-5-methoxybenzyl)acetamide: a potent iodinated radioligand for the peripheral-type benzodiazepine receptor in brain. *J Med Chem* 50:848-55

- Zhang MR, Kumata K, Maeda J, Yanamoto K, Hatori A, et al. 2007b.  $^{11}\text{C}$ -AC-5216: a novel PET ligand for peripheral benzodiazepine receptors in the primate brain. *J Nucl Med* 48:1853-61
- Zhang MR, Maeda J, Furutsuka K, Yoshida Y, Ogawa M, et al. 2003b. [ $^{18}\text{F}$ ]FMDAA1106 and [ $^{18}\text{F}$ ]FEDAA1106: two positron-emitter labeled ligands for peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *Bioorg Med Chem Lett* 13:201-4
- Zhang MR, Maeda J, Ogawa M, Noguchi J, Ito T, et al. 2004a. Development of a new radioligand, N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethyl-5-methoxybenzyl)acetamide, for pet imaging of peripheral benzodiazepine receptor in primate brain. *J Med Chem* 47:2228-35
- Zhang MR, Maeda J, Ogawa M, Noguchi J, Ito T, et al. 2004b. Development of a new radioligand, N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethyl-5-methoxybenzyl)acetamide, for PET imaging of peripheral benzodiazepine receptor in primate brain. *J Med Chem* 47:2228-35
- Zhou D, Lee H, Rothfuss JM, Chen DL, Ponde DE, et al. 2009. Design and synthesis of 2-amino-4-methylpyridine analogues as inhibitors for inducible nitric oxide synthase and in vivo evaluation of [ $^{18}\text{F}$ ]6-(2-fluoropropyl)-4-methyl-pyridin-2-amine as a potential PET tracer for inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 52:2443-53
- Zisterer DM, Williams DC. 1997. Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Gen Pharmacol* 29:305-14

## Evaluation préclinique d'un nouveau radiopharmaceutique : Le CLINDE

### Résumé

La protéine translocatrice 18kDa (TSPO), en reflétant l'activation microgliale et la neuroinflammation, est actuellement reconnue comme un marqueur sensible de la survenue d'événements pathologiques dans le cerveau. Par conséquent, la TSPO est une cible privilégiée pour l'étude des pathologies du cerveau par imagerie moléculaire (TEP/TEMP). Il y a actuellement un manque d'outils efficaces pour explorer la neuroinflammation en TEMP. Notre objectif a donc été d'évaluer un nouveau radiopharmaceutique de forte affinité pour la TSPO, utilisable en TEMP : le CLINDE, dans deux modèles animaux : l'excitotoxicité focale et l'ischémie cérébrale. Dans ces deux modèles, les études *ex vivo* ont mis en évidence une accumulation préférentielle du [<sup>125</sup>I]-CLINDE dans les régions cérébrales lésées, riches en cellules microgliales. De plus, nous avons observé une relation quantitative entre l'intensité de la lésion cérébrale et la fixation du radiopharmaceutique. Le CLINDE apparaît donc comme un candidat très prometteur pour l'imagerie TEMP de la neuroinflammation en recherche clinique.

Mots-clé : radiopharmaceutiques ; neuroinflammation ; imagerie moléculaire ; microglie activée

### Résumé en anglais

The 18kDa Translocator protein (TSPO) is currently the most reliable marker for pathological events in the brain, reflecting microglial activation and neuroinflammation, which are linked to neuronal damage. Thereby, TSPO is a potential target to evaluate neuroinflammatory changes in a variety of brain diseases by molecular imaging (PET/SPECT). To date, there is a lack of effective tool to explore neuroinflammation by SPECT. Our aim was to evaluate a new high-affinity ligand for TSPO SPECT imaging: the CLINDE, in two rodent models: focal excitotoxicity and cerebral ischemia. In both animal models, *ex vivo* studies highlighted preferential localisation of [<sup>125</sup>I]-CLINDE accumulation in cerebral area that also expressed activated microglial cells as assessed by immunohistochemical staining. Moreover, we found a quantitative relationship between the intensity of brain damages and radiotracer binding, making CLINDE an attractive radioionidated candidate for imaging neuroinflammation by SPECT in clinical setting.

Keywords: radiopharmaceuticals; neuroinflammation; molecular imaging; activated microglia